COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
29 SEP 1959

BEITRÄGE

ZUR

PHYSIOLOGISCHEN ANATOMIE

DER

PILZGALLEN

VON

HERMANN RITTER VON **GUTTENBERG**
DR. PHIL.,
ASSISTENT AM BOTANISCHEN INSTITUT DER K. K. UNIVERSITÄT GRAZ

MIT VIER LITHOGRAPHIERTEN TAFELN

LEIPZIG
VERLAG VON WILHELM ENGELMANN
1905

Alle Rechte, besonders das der Übersetzung, werden vorbehalten.

INHALT.

Seite

Einleitung 1
Albugo candida auf Capsella Bursa pastoris 5
Exoascus amentorum auf Alnus incana 17
Ustilago Maydis auf Zea Mays 21
Puccinia Adoxae auf Adoxa Moschatellina 41
Exobasidium Rhododendri auf Rhododendron ferrugineum und Rh. hirsutum . 50
Gesamtergebnis 59
Literaturverzeichnis 65
Erklärung der Abbildungen 67

Einleitung.

Während unsere Kenntnis der Morphologie und Systematik phytoparasitischer Pilze in letzter Zeit durch eine Reihe von Arbeiten erweitert wurde und einen steten Fortschritt aufzuweisen hat, stehen eingehendere Untersuchungen über die von Pilzen an höheren Pflanzen hervorgerufenen Mißbildungen, über die Pilzgallen oder Mycocecidien, derzeit noch aus. Die Zahl der Arbeiten, welche diesen Gegenstand behandeln, ist eine geringe, besonders im Vergleiche zu der umfangreichen Literatur, die über Zoocecidien, dann auch über Mycorrhizabildungen bereits vorliegt. Auch Küster [1]) räumt in seiner »Pathologischen Pflanzenanatomie« der Besprechung der Mycocecidien nur wenig Platz ein. Eigene Untersuchungen scheint der genannte Verfasser auf diesem Gebiete nicht angestellt zu haben; er begnügt sich damit, auf die vorhandene Literatur zu verweisen und die in ihr enthaltenen Tatsachen zusammenfassend anzuführen.

Ich will mich hier auf die Besprechung der einschlägigen Arbeiten nicht näher einlassen; vielmehr soll bei jedem der untersuchten und zu beschreibenden Fälle die darauf bezügliche Literatur kurz angeführt werden. Nur eines will ich vorausschickend bemerken: die bisherigen anatomischen Untersuchungen über Mycocecidien sind fast ausnahmslos rein deskriptiv gehalten. Es werden die Befunde an erkrankten Pflanzenteilen beschrieben und mit den normalen verglichen; vielfach wird dabei auch die Entwicklungsgeschichte berücksichtigt, nirgends aber wird eine wissenschaftliche Erklärung der Veränderungen versucht. Nun wissen wir freilich über die bei der Gallbildung eigentlich wirksamen Ursachen so gut wie nichts. Denn direkte chemische oder physikalische Einwirkungen des Parasiten, die wir mit Küster als Kraftwirkungen bezeichnen können,

1) Siehe das alphabetische Literaturverzeichnis. Verschiedene Arbeiten eines Autors sind durch dem Namen nachgesetzte römische Ziffern unterschieden.

spielen dabei nur eine untergeordnete Rolle; darüber aber, wie die viel wichtigeren Reizwirkungen zustande kommen, können derzeit nur Vermutungen gehegt werden.

Können wir also auch von den eigentlich wirkenden Ursachen nicht ausgehen, so bleibt uns doch die Möglichkeit einer Erklärung der anatomischen Veränderungen in anderer Richtung: wenn wir nämlich den Zusammenhang zwischen anatomischem Bau und physiologischer Funktion zum Ausgangspunkt wählen. Wir finden dann als letzte Ursache der Veränderungen den Funktionswechsel, unter Umständen auch den Funktionsverlust, welche beide in unserem Falle durch die Ansprüche, die der Parasit an seine Wirtpflanze stellt, hervorgerufen werden. Dieser begnügt sich nicht damit, die Pflanze, wie er sie bei der Infektion antrifft, auszunützen, er verlangt vielmehr von ihr neue Leistungen ausschließlich zu seinem Nutzen und zwingt sie zur Ausbildung dementsprechender, also vom Normalen abweichender Zellen und Gewebe.

Von diesem anatomisch-physiologischen Gesichtspunkt aus wurde die vorliegende Untersuchung durchgeführt. Es soll versucht werden, das Auftreten veränderter oder neuer Gewebe in Pilzgallen aus den Funktionen zu erklären, die der Parasit von seiner Wirtpflanze verlangt. Die Erkenntnis dieser Funktionen wird durch den Vergleich der Gallengewebe mit normalen natürlich sehr erleichtert; jedoch nicht mit jenen von gleicher entwicklungsgeschichtlicher Herkunft, sondern mit solchen, die gleichen oder ähnlichen anatomischen Bau besitzen. Denn man wird mit gutem Grund annehmen können, daß pathologisch entstandene Gewebe denjenigen normalen, mit welchen sie im anatomischen Bau übereinstimmen, funktionsgleich sind.

Als bestes Einteilungsprinzip für die abnormalen Gewebe ergibt sich dann wie für die normalen die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Funktion. Am Schluß meiner Arbeit will ich die Untersuchungsergebnisse in dieser Weise kurz zusammenfassen. Küster hat die Vorteile einer Einteilung, die von physiologischen Gesichtspunkten ausgeht, wohl erkannt, trotzdem hat er eine solche nur bei Besprechung der Prosoplasmen, zu denen er die Hauptmasse der Zoocecidien rechnet, durchgeführt. Bei der Einteilung des gesamten Stoffes schien es ihm angebracht, »pathologische Gewebeformen von gleicher Entwicklungsgeschichte und gleicher histologischer Zusammensetzung in selbständigen Gruppen zu vereinigen und zu besprechen«, und zwar deshalb, »weil die Betonung funktioneller Charaktere, durch

welche die abnormalen Zellen und Gewebe gekennzeichnet werden, zwar im groben unser Arbeitsgebiet zu umgrenzen gestattet, eine völlig scharfe Scheidung des Pathologischen vom Normalen sich aber auf diesem Wege nicht durchführen läßt«. Nun ist es ja richtig, daß »die mikroskopische Untersuchung der Struktur der Gewebe nicht immer Schlüsse auf ihre physiologische Bedeutung möglich macht«, aber das trifft bei normalen Geweben schließlich ebenso zu wie bei abnormalen. War es nun bei ersteren trotzdem möglich, eine Einteilung nach anatomisch-physiologischen Grundsätzen mit Erfolg durchzuführen (Haberlandt I), so ist nicht einzusehen, warum dies nicht auch bei den abnormalen gelingen sollte. Daß dieselben »der experimentellen Untersuchung oft nicht zugänglich sind«, fällt deshalb weniger ins Gewicht, weil im allgemeinen wirklich neue Gewebe, das sind solche, welche sich normal im Pflanzenreich überhaupt nicht finden, nicht zur Ausbildung gelangen. Für diejenigen abnormalen Gewebe aber, denen analoge Bildungen in normalen Pflanzen entsprechen, können die an letzteren gewonnenen Versuchsergebnisse verwertet werden. Auf die Vorteile einer Einteilung der pathologischen Gewebe nach anatomisch-physiologischen Gesichtspunkten hier näher einzugehen, ist überflüssig: es sind dieselben, die Haberlandt in seiner »Physiologischen Pflanzenanatomie«[1]) für die normalen Gewebe auseinandergesetzt hat.

Auf Grund histologischer Momente sah sich Küster veranlaßt, alle Gallbildungen, die nach seiner Einteilung zu den heteroplastischen Hyperplasien gehören, das sind Massenzunahmen eines Organs, bei denen durch abnormale Zellteilungen Gewebe zustande kommen, deren einzelne Elemente nicht den normalen gleichen, in zwei Gruppen zu trennen, die er als Kataplasmen und Prosoplasmen bezeichnet. Zu den ersteren gehören »diejenigen Gallen beliebiger Herkunft, die durch den geringen Grad ihrer Gewebedifferenzierung sich von dem normalen Gewebe entsprechender Organe unterscheiden«. »Die Differenzierung der einzelnen Zellen entspricht dem, was oben für die Callus- und Wundholzgewebe zu sagen war. Weiterhin kennzeichnet die Kataplasmen ihr Mangel an einer bestimmten, charakteristischen Form und gesetzmäßig wiederkehrenden Größenverhältnissen.« Die Prosoplasmen dagegen zeichnen sich dadurch aus, »daß ihre Gewebe hinsichtlich ihrer Differenzierung nicht die histologischen Charaktere der Hemmungsbildungen und Callusgewebe zeigen, sondern neuartige,

1) 3. Aufl., Leipzig 1904, Einleitung und S. 55/56.

vom Normalen durchaus verschiedene Differenzierungen ausbilden, — und weiterhin dadurch, daß bei ihnen bestimmte Formen und Größenverhältnisse artcharakteristisch sich immer wiederholen«. Die ihm vorliegenden Angaben veranlaßten Küster, sämtliche Mycocecidien mit nur zwei Ausnahmen [1]) als Kataplasmen zu bezeichnen, während die große Mehrzahl der Zoocecidien zu den Prosoplasmen gerechnet wird. Eine Konstanz der Form liegt nun allerdings bei Pilzgallen im allgemeinen nicht vor, und zwar, wie auch Küster betont, schon deshalb nicht, weil der Pilz in seiner Nährpflanze — besonders wenn er sie im jugendlichen Zustande befällt — kein scharf begrenztes Verbreitungsgebiet besitzt. Dagegen ist der histologische Bau der Mycocecidien durchaus nicht immer so einfach, wie Küster angenommen hat, vielmehr kommt es, wie mir meine Untersuchungen gezeigt haben, in manchen Fällen zu ziemlich weitgehenden Differenzierungen, welche die bei Callus und Wundholz beobachteten jedenfalls übertreffen, wenn sie auch die in vielen Zoocecidien vorhandenen nicht erreichen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Graz ausgeführt. Bevor ich zur Beschreibung der einzelnen Fälle übergehe, drängt es mich, Herrn Professor Dr. G. Haberlandt, der mich zu Studien auf dem Gebiete der pathologischen Pflanzenanatomie anregte und mir im Verlaufe der Untersuchung stets mit seinem Rate zur Seite stand, meinen aufrichtigen Dank zu sagen. Desgleichen bin ich Herrn Professor Dr. E. Palla für manche wertvolle Anregung zu Dank verpflichtet.

1) Ustilago Treubii und Synchytrium pilificum. Die übrigen Synchytriumgallen werden als Hypertrophien beschrieben.

Albugo candida

auf

Capsella Bursa pastoris.

Ausführliche Untersuchungen des Einflusses, welchen dieser Pilz auf seine Wirtpflanzen in anatomischer Hinsicht ausübt, hat Wakker angestellt. Er beschreibt die Veränderungen einer Reihe von Cruciferen, darunter auch von Capsella. Mit der infizierten Infloreszenz der letztgenannten Pflanze beschäftigte sich ferner Molliard (I), während Peglion an Raphanus Raphanistrum das Auftreten des Pilzes und seine Folgen studierte. Es wäre zwecklos, die Befunde dieser Autoren zu wiederholen. Ich verweise auf ihre Arbeiten und will mich hier auf die Angabe einiger Tatsachen beschränken, welche von ihnen übersehen wurden und zum Teil gerade in anatomisch-physiologischer Beziehung von Interesse sind.

Was zunächst das Auftreten des Pilzes auf Capsella betrifft, so sind zwei Arten von Infektion zu unterscheiden. Entweder ist die Pflanze in allen oberirdischen Teilen vom Pilze befallen, oder es ist nur der oberste Teil der Infloreszenzachse infiziert. Im ersten Falle bleibt die Pflanze niedrig, dabei fast oder ganz unverzweigt. Sie besitzt häufig Infloreszenzen, welche aber nur selten normale Blüten und niemals normale Früchte tragen. Die Conidienlager — Albugo bildet auf Capsella bekanntlich nur Conidien — zeigen sich zuerst an der Unterseite der Blätter, später auch an deren Oberseite und an der Achse, schließlich in der Infloreszenz. Die Infektion hat jedenfalls schon an der Keimpflanze stattgefunden, und die Pflanze ist unter dem Einflusse des Parasiten zu kümmerlicher Entwicklung gelangt. Im andern Falle handelt es sich um eine Infektion schon ausgewachsener Pflanzen; diese sind normal entwickelt, das Auftreten des Pilzes ist auf das Ende der Infloreszenzachse beschränkt. Die meristematische Vegetationsspitze scheint also dem Eindringen des Parasiten ebensowenig Widerstand entgegensetzen zu können, wie die Gewebe des Keimlings.

Die ersten Anfänge der Bildung eines Conidienlagers sind — besonders am Stengel — häufig durch das Vorhandensein von Anthocyan zu erkennen. Dieses findet sich dann im Zellsafte der unter dem Hymenium befindlichen Zellage, im Stengel also in der äußersten Rindenschicht. Die Untersuchungen Overtons machen es Küster wahrscheinlich, daß ein erhöhter Zuckergehalt die Ursache dieser in Gallen so oft beobachteten Erscheinung sei. Wie schon Wakker gefunden hat, findet unter dem Einflusse des Pilzes eine erhöhte Chlorophyllbildung und damit eine erhöhte Assimilation statt. Auch die Zahl der assimilierenden Zellen hat, besonders unter den Conidienlagern, sowohl in der Achse als im Blatte, zugenommen. Es findet also eine große Ansammlung von Kohlehydraten statt, welche ausschließlich dem Pilze zugute kommen, was bereits Wakker veranlaßte, von einem Nährgewebe zu sprechen. Daß es sich tatsächlich um ein solches handelt, geht vor allem daraus hervor, daß das Mycel des Pilzes massenhaft die bekannten, kleinen, knopfförmigen Haustorien in diese Zellen entsendet. Soll nun der Pilz die durch Assimilation der Wirtpflanze erzeugte Stärke auf osmotischem Wege aufnehmen, so kann dies nur geschehen, wenn diese zuerst in ein lösliches Kohlehydrat verwandelt wird. Es ist naheliegend, anzunehmen, daß es sich dabei um Umwandlung in eine Zuckerart handelt; auch ist es wahrscheinlich, daß die Zuckerbildung am stärksten in der dem Hymenium unmittelbar anliegenden Zellschicht vor sich geht. Es ist also ganz gut möglich, daß dieser erhöhte Zuckergehalt die Anthocyanbildung hier ebenso veranlaßt, oder wenigstens ermöglicht, wie in den von Overton beschriebenen Fällen.

Das Nährgewebe geht im Blatt aus dem Palisadengewebe und dem Schwammparenchym hervor. In der Achse beteiligen sich an seiner Bildung das Rindenparenchym und die Stärkescheide, in der Frucht nimmt es — abgesehen von der beiderseitigen Epidermis — die ganze Wand des Schötchens ein. Trotz dieses verschiedenen Ursprungs zeigt es überall den gleichen Bau: es besteht aus rundlichen, ziemlich fest aneinanderschließenden Zellen, die massenhaft Chlorophyllkörner enthalten. Die in denselben vorhandene Stärke wird wohl nur zum Teil durch Assimilation gewonnen. Besonders in der Frucht spricht die später zu beschreibende Vermehrung der Leitungsbahnen dafür, daß dem Nährgewebe reichlich Stoffe zugeleitet werden. Was die Zellkerne dieses Gewebes betrifft, so beobachtete ich im Rindenparenchym eines Fruchtstieles nach Färbung mit Boraxkarmin ziemlich weitgehende Veränderungen. Die Kerne übertreffen

die normalen bedeutend an Größe. Letztere sind sehr klein, meist linsenförmig und liegen in der Regel der Zellwand eng an (Taf. I Fig. 1). Im infizierten Gewebe dagegen lagern sie meist in der Mitte der Zelle, von einer größeren Plasmaansammlung umgeben. Sie sind zum Teil von runder Gestalt und enthalten dann einen von einem oft sehr großen Hof umgebenen Nucleolus. Sehr häufig aber sind sie verschiedentlich gelappt oder segmentiert, was bis zur Amitose führen kann, in welchem Falle meist mehrere Nucleolen auftreten, so zwar, daß jedes Segment oder jeder neue Kern einen, selten mehr Nucleolen enthält (Taf. I Fig. 2). Die übrige Kernsubstanz ist feinkörnig, besondere Chromatinstrukturen lassen sich in ihr nicht nachweisen. In mehreren Fällen konnte ich beobachten (Taf. I Fig. 3), daß schließlich die Kernmembran zum Teil sich auflöst und die Kernsubstanzen in das umgebende Plasma austreten.

In den infizierten Achsen findet sich der Pilz jedoch nicht nur in der Rinde, sondern auch im Mark. Die Verbindung wird dann durch Hyphen hergestellt, welche die primären Markstrahlen durchsetzen. Letztere zeigen in diesem Fall einen vom Normalen ganz abweichenden Bau. Während nämlich in der gesunden Achse zwischen den in einem Kreis angeordneten Gefäßbündeln die Markstrahlen aus dickwandigen, verholzten Zellen bestehen, sind sie im erkrankten Stengel aus dünnwandigen, parenchymatischen Zellen zusammengesetzt, die meist gar nicht, oder doch nur schwach, verholzt sind. Es liegt hier also einer von den vielen Fällen vor, wo ein Gewebe im »Jugendzustande« verharrt. Der Vorteil für den Parasiten ist auf der Hand liegend. Die verholzten Markstrahlen setzen seinem Wachstum einen Widerstand entgegen, den er nicht zu überwinden vermag. Erfolgt die Infektion aber zu einer Zeit, wo die Verholzung noch nicht eingetreten ist, so verhindert der Pilz ihr Zustandekommen, um auch die Markstrahlen und vor allem das Mark für seine Ernährung ausnützen zu können. Das von Peglion für Raphanus beobachtete Ausbleiben der Verholzung an Gefäßen konnte ich an meinem Objekt nicht konstatieren.

In mehrfacher Hinsicht von Interesse und bisher noch nirgends eingehender beschrieben ist die Anlage und das Aufbrechen der subepidermalen Conidienlager. Am bequemsten ist dasselbe am Stengel zu beobachten, und auf diesen beziehen sich zunächst meine Angaben; doch will ich gleich hier bemerken, daß die Verhältnisse im Blatt und in der Frucht in diesem Punkte keine wesentliche Verschiedenheit aufweisen. Das im Nährgewebe wuchernde

Mycel dringt zunächst an einer Stelle unter die Epidermis vor und löst dieselbe von der darunterliegenden Zellschicht gänzlich los. Dabei werden in die Epidermiszellen sehr zahlreiche Haustorien entsendet, welche, besonders bei Betrachtung der Oberfläche, leicht zu sehen sind. Sie haben hier den gleichen Bau wie in den übrigen Geweben. Die Membran der Wirtzelle wird durch einen feinen Fortsatz durchbohrt, worauf das Haustorium zu einem kugeligen Köpfchen anschwillt. Dieses verletzt aber den Protoplasten niemals, es stülpt ihn vielmehr nur ein, was überall ohne weiteres daran erkannt werden kann, daß das Körnerplasma die Haustorien kontinuierlich überzieht (Taf. I Fig. 4). Diese Verhältnisse lassen sich am besten nach Behandlung mit Chlorzinkjod studieren. Es färben sich dann unter gleichzeitiger Verquellung die Wände der Wirtzellen zunächst hellblau, die Pilzhyphen aber sofort schwarzviolett. Die Haustorien dagegen bräunen sich, ohne zu verquellen, und heben sich nun vom blauen Grunde deutlich ab. — Sehr bald aber treiben dieselben Hyphen, welche früher die Haustorien bildeten, Conidienträger von keuliger Gestalt, welche nach außen wachsen und dabei mit ihrem Scheitel die abgelöste Epidermis emporheben. Das hat zur notwendigen Folge, daß sämtliche früher in die Epidermis entsendeten Haustorien abgerissen werden (Taf. I Fig. 5). Diese sterben dann ab ihr Inhalt ist nicht mehr wie im lebenden Zustande feinkörnig, sondern homogen, und sie enthalten meist eine Vakuole. Sobald die Haustorien derart abgerissen sind, werden sie von der Wirtzelle mit einer Zellulosekappe umgeben. Diese Hülle, wahrscheinlich ein Produkt der Hautschicht des Protoplasten, umgibt das Haustorium im optischen Querschnitte kreisförmig und ist gegen das Innere der Zelle zu dicker. Erst nach Behandlung mit Chlorzinkjod erkennt man deutlich, daß die Hülle in die Membran der Wirtzelle übergeht; sie färbt sich blau und ist nun an allen Haustorien der Epidermis zu beobachten (Taf. I Fig. 5 u. 6). Betrachtet man eine abgehobene Epidermis von oben und stellt auf den Grund der Zellen ein, so sieht man sämtliche Haustorien von einem Zellulosering umgeben (Taf. I Fig. 7). — Die Bildung der Zellulosehülle erfolgt in der Epidermis also erst sekundär, es handelt sich daher nicht um eine bloße Zellwandeinstülpung, wie DE BARY (S. 21) angenommen hat. Nicht selten kommt es auch im Nährgewebe, besonders im Rindenparenchym, zur Bildung derartiger Hüllen. Es werden aber auch hier nur diejenigen Haustorien eingeschlossen, welche durch die fettige Degeneration ihres Plasmas erkennen lassen, daß sie im Absterben begriffen sind. Den

Haustorien scheint nur eine kurze Lebensdauer beschieden zu sein; sie gehen bald zugrunde und werden durch neue ersetzt. Daß die Bildung der Hülle auch in diesem Gewebe erst nachträglich erfolgt, wird dadurch zum mindesten sehr wahrscheinlich gemacht, daß man viele Haustorien findet, welche zunächst nur von einem Hofe von hyalinem Plasma umgeben sind, das sich mit Chlorzinkjod zum Teil nicht, zum Teil aber ganz schwach blau färbt. Es wandelt sich also allem Anscheine nach das hyaline Plasma zur Zellulosehülle um.

Es sei gleich hier mit einigen Worten auf die Bedeutung dieser Zellulosebildung eingegangen. Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man darin eine Schutzmaßregel der infizierten Zelle sieht. Es handelt sich jedenfalls darum, einen schädlichen Fremdkörper auszuschließen, ähnlich wie Endprodukte des Stoffwechsels, z. B. der oxalsaure Kalk, durch Einhüllung in Zellulose unschädlich gemacht werden. Ich werde im folgenden auf ähnliche Zellulosebildungen noch wiederholt zu sprechen kommen und Gelegenheit finden, auf die diesbezüglichen Literaturangaben zu verweisen. Hier sei nur bemerkt, daß eine solche nachträgliche Einschließung in Zellulose von Magnus in den »Verdauungszellen« der Mycorrhiza von Neottia Nidus avis beobachtet wurde, während Shibata bei Psilotum triquetrum eine Einhüllung der verdauten Hyphen durch Amyloidsubstanz beschreibt. — Wie erwähnt, werden in unserem Falle nur die toten oder absterbenden Haustorien mit Zellulose umgeben. Es ist nun einerseits möglich, daß die Wirtzelle nicht imstande ist, das lebende Haustorium einzuschließen, da dieses derartige Bestrebungen des Protoplasten durch seine zelluloselösende Wirkung vereitelt. Andererseits kann man daran denken, daß das Haustorium beim Zugrundegehen giftige Zersetzungsprodukte ausscheidet und so der Pflanze schädlicher zu werden droht, als das lebende. Eine besondere Anteilnahme des Zellkernes an der Zellulosebildung, wie ich sie in einem später zu beschreibenden Falle fand, läßt sich hier schon deshalb nicht konstatieren, da die Zahl der in eine Zelle entsendeten Haustorien meist eine sehr große ist, und sie von allen Seiten her eindringen. — Die vergleichsweise Untersuchung von Albugo candida auf Arabis ciliata zeigte, daß auch bei dieser Pflanze in der abgehobenen Epidermis die abgerissenen Haustorien des Pilzes mit Zellulosekappen bedeckt werden (Taf. I Fig. 8 u. 9).

Kehren wir nunmehr zur Beschreibung der abgehobenen Epidermis selbst zurück, so muß zunächst betont werden, daß diese, wie schon aus der Abkapselung der Haustorien hervorgeht und

Plasmolysierversuche beweisen, noch ziemlich lange am Leben bleibt. Sie zeigt zunächst keine wesentlichen Veränderungen, auch die Spaltöffnungen behalten ihr normales Aussehen. Mit zunehmender Spannung aber beginnen die Epidermiszellen zu wachsen. Daß es sich dabei nicht bloß um eine passive Dehnung handelt, geht vor allem daraus hervor, daß in den sich vergrößernden Zellen auch der Kern, und zwar in noch stärkerem Maß, an Größe zunimmt. So stellte sich das Verhältnis von Kernlänge zu Zellänge in der nicht abgehobenen Epidermis eines Stengels wie 1 : 4,3, in der abgehobenen dagegen wie 1 : 2,7. Ist nun schon der normale spindelförmige Kern durch das Auftreten einzelner peripherer Chromatinkügelchen ausgezeichnet, so steigert sich diese Erscheinung im Kerne der abgehobenen Zellen in auffälliger Weise. Nach Färbung mit Boraxkarmin sieht man zu beiden Seiten desselben je eine Reihe sich intensiv färbender Kugeln. Im Nucleolus, der sich von ihnen deutlich unterscheidet, finden sich öfters kleine Vakuolen (Taf. I Fig. 10). Da ich später (bei Puccinia Adoxae auf Adoxa Moschatellina) auf ähnliche Kernveränderungen noch zu sprechen komme, soll erst dort auf die Erscheinung näher eingegangen werden.

Die Epidermis bleibt also noch am Leben, während unter ihr der Pilz schon eine Reihe von Conidien gebildet hat. Endlich öffnet sich die derart entstandene weiße Blase durch einen Längsspalt. Betrachtet man diesen unter dem Mikroskop, so fällt zunächst auf, daß der Riß genau nach den Zellgrenzen erfolgt. Die Cuticula dagegen wird ganz unregelmäßig gesprengt, so daß sie oft auf der einen Rißseite weit vorspringt und auf der andern über größere Strecken fehlt. Die an die Spalte grenzenden Zellen sind abgestorben, dabei sind ihre Mittellamellen gequollen und verschleimt. Mit Delafield-schem Hämatoxylin färben sich die letzteren intensiv schwarzviolett (Taf. I Fig. 11). Betrachtet man derartige Zellen unter Wasser im Querschnitt, so sieht man, daß ihre Membranen allseits stark verquollen sind und nun deutliche Schichtung aufweisen (Taf. I Fig. 12). Während in der normalen Stengelepidermis (Taf. I Fig. 13) die durchschnittliche Dicke der Außenwände 2 μ, der Innenwände 1,2 μ beträgt, sind die entsprechenden Zahlen für die gequollene Epidermis 8 μ und 4 μ. Die Membranen haben also um das Vierfache an Dicke zugenommen, weniger stark sind die Radialwände verändert. Die Verschleimung der Mittellamellen der letzteren hat zur Folge, daß die Zellen ungemein leicht auseinanderfallen. Diese leichte Trennbarkeit, verbunden mit der Quellbarkeit der Zellen, bildet eine sehr

zweckmäßige Einrichtung zum Zerreißen der Blasen. Sobald nämlich Wasser zutritt, quellen die abgestorbenen Zellen plötzlich auf, nehmen dabei bedeutend an Volumen zu, runden sich ab und drücken gegeneinander. Durch diesen plötzlichen Druck und die vorhandene Spannung werden sie an den verschleimten Mittellamellen getrennt und so heftig auseinandergerissen, daß sie abgeschleudert werden; es gelingt daher sehr selten, derart gequollene Zellen auf Querschnitten zu beobachten. Nur wenn man zu Schnitten von Alkoholmaterial vorsichtig Wasser zusetzt, wird es möglich, die Erscheinung zu verfolgen.

Es liegt hier also eine für die Ausbreitung der Sporen des Pilzes sehr zweckmäßige Einrichtung vor. Der Pilz veranlaßt hier nicht, wie das in später zu beschreibenden Fällen zutrifft, eine mechanisch schwächere Ausbildung der Epidermis, die eine leichte Sprengung der letzteren ermöglicht, sondern es tritt eine Veränderung der normalen Zellen ein, welche das Aufreißen der Blasen und damit das Ausfallen der Conidien zur Folge hat. Ob diese Veränderung vom Pilze herbeigeführt wird, oder eine bloße Absterbeerscheinung ist, muß dahingestellt bleiben. Im allgemeinen sind derartige Erscheinungen an absterbenden Zellen wohl nicht zu beobachten. Ihre auffällige Zweckmäßigkeit legt es nahe, anzunehmen, daß sie vom Pilze eingeleitet werden. Dabei ist zu bemerken, daß der Pilz nach dem Abreißen der Haustorien immer noch mit der abgehobenen Epidermis in einer Weise in Verbindung steht. Die erstgebildete Conidie jedes Trägers haftet nämlich der Epidermis fest an, sie ist geradezu mit ihr verklebt und selbst mit dem Pinsel nur schwer abzustreifen. Dabei zeigen diese Conidien an der Berührungsstelle einen abweichenden Bau und ein abweichendes chemisches Verhalten. Sie sind hier nämlich deutlich verdickt (Taf. I Fig. 6), und diese verdickte Membranstelle färbt sich mit Chlorzinkjod violett, während der übrige Teil der Membran sich bräunt, was bei den später gebildeten Conidien im ganzen Umfange stattfindet. — Es ist bekannt, daß diese ersten Conidien keimungsunfähig sind. DE BARY (S. 149) hat ihnen eine mechanische Funktion zugesprochen, nämlich den zur Sprengung der Epidermis nötigen Druck auszuhalten. Da diese aber erst eintritt, wenn schon eine Reihe von Conidien gebildet ist, die natürlich ganz den gleichen Druck auszuhalten haben, ohne verdickt zu sein, das erste Ablösen der Epidermis aber schon durch die vegetativen Hyphen auf chemischem Weg erfolgt, wird diese mechanische Deutung hinfällig. Es wäre also vielleicht an eine

chemische Funktion der ersten Conidien zu denken, derart, daß diese durch Ausscheidung eines Stoffes die zum Aufbrechen der Blasen nötigen Veränderungen in den Epidermiszellen herbeiführen. Das Vorhandensein einer Durchlaßstelle sowie das feste Ankleben der Conidien an der Epidermis geben für eine derartige Deutung immerhin Anhaltspunkte.

Sobald das Öffnen der Blasen erfolgt ist, werden eine Zeitlang vom Pilze Conidien abgeschnürt. Dieser Vorgang dauert so lange, bis das Nährgewebe erschöpft ist. Es stirbt dann von außen her ab, wobei die Zellen kollabieren und ihre Membranen sich derart chemisch verändern, daß sie der Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure widerstehen und sich mit Chlorzinkjod braun färben, sich also wie cutinisierte Membranen verhalten. Betrachtet man ältere Stengel, welche in ihrem oberen Teile noch frische weiße Conidienlager tragen, so findet man weiter unten oft größere braun gefärbte Strecken, welche die Narben älterer Lager darstellen. Sie machen äußerlich den Eindruck eines Periderms, zeigen aber folgenden anatomischen Bau. Die Hauptmasse des Gewebes wird aus den eben beschriebenen cutinisierten Rindenzellen, zwischen welchen überall die Hyphen des Pilzes verlaufen, gebildet. Es gehen dabei die 3—5 äußersten Zellagen des Rindenparenchyms zugrunde, während die weiter innen befindlichen Schichten ihr Aussehen nicht verändern. Zu einer eigentlichen, von einem Phellogen ausgehenden Korkbildung, wie sie Wörnle an den Nadeln von Juniperus communis nach Infektion durch Gymnosporangium juniperinum beobachtete, kommt es also hier nicht. Über den beschriebenen cutinisierten Zellen befinden sich die Conidienträger des Pilzes, welche jetzt nach Erfüllung ihrer Funktion einen veränderten Anblick gewähren. Sie haben entweder keulenförmige Gestalt oder tragen noch eine Conidienanlage, deren Entwicklung mehr oder minder weit fortgeschritten ist (Taf. I Fig. 14). Es fällt sofort auf, daß der obere Teil des Trägers sowie die Conidienanlagen nicht die normale Dünnwandigkeit besitzen, sondern von einer derben Membran umgeben sind, welche allmählich in die untere Verdickung des Trägers übergeht. Während nun der normale Träger in seiner oberen unverdickten Hälfte, wie auch die Conidien von ihrer ersten Anlage an mit Chlorzinkjod sich bräunen, färbt sich jetzt die Membran des ganzen Gebildes unter Verquellung violettblau, reagiert also wie die Hyphen auf Zellulose. Auch der plasmatische Inhalt ist wesentlich verändert. Seine feinkörnige Struktur ist verschwunden, er hat

sich in eine fast homogene, fettartige Masse verwandelt, so daß man von einer fettigen Degeneration des Plasmas sprechen kann.

Diese gänzlich veränderten Conidienträger des Pilzes bilden mit den zugrunde gegangenen Zellen des Nährgewebes gemeinsam ein Vernarbungsgewebe. Dieses erfüllt die Funktionen der verloren gegangenen Epidermis; es bildet zunächst einen Schutz gegen mechanische Einwirkungen von außen her, ferner verhindert es durch seinen Gehalt an Fettstoffen allzu große Transpirationsverluste. Von anatomisch-physiologischen Gesichtspunkten ausgehend, können wir es also als sekundäres Hautgewebe bezeichnen. Daß dieses sein Entstehen dem Zusammenwirken von Pilz und Wirt verdankt, braucht schon deshalb nicht wunderzunehmen, weil es für beide Teile von Vorteil ist. Nur dadurch nämlich, daß die Wunden des Stengels geschlossen werden, wird es ermöglicht, daß er sein Wachstum fortsetzt und nicht zugrunde geht; das kommt aber natürlich auch dem Pilze zugute, der in der sich weiter entwickelnden Achse fortwächst und so Gelegenheit zur Anlage weiterer Conidienlager erhält. Für das Weiterwachsen der Achse ist ferner die Tatsache sehr wichtig, daß der Pilz die Vegetationsspitze selbst nie zerstört, obwohl doch gerade diese ihm keinen Widerstand entgegensetzen kann und reichlich Nährstoffe enthält. Ähnliches beobachtete Groom (S. 338) an der endotrophen Mycorrhiza von Thismia Aseroe: die Hyphen des Pilzes dringen stets erst dann in die Zellen des Wirtes ein, wenn diese ihre Kernteilung vollendet haben. Bei Neottia Nidus avis konnte ich selbst feststellen, daß die Wurzelspitze stets pilzfrei ist.

Es erübrigt noch die Veränderungen der Früchte zu besprechen, für welche Wakker nur das Auftreten akzessorischer Gefäßbündel und das Unterbleiben der Bildung von Samenknospen angibt. Während in den übrigen Teilen der Pflanze der Pilz eher eine Hemmung als eine Förderung in der Entwicklung herbeiführt, regt er die Früchte zu ungewöhnlichem Wachstum an. Sie erreichen nicht selten ein Mehrfaches der normalen Größe und sind an ihrer Oberfläche über und über von Conidienlagern bedeckt, welche schließlich ineinander übergehen, so daß die ganze äußere Epidermis abgehoben wird. Das Auswachsen der Schötchen zu großen Taschen geht also nach dem Prinzip der Oberflächenvergrößerung vor sich, indem dadurch das Hymenium des Pilzes bedeutend an Ausdehnung gewinnt. — Die Epidermis der Außenseite, die, wie erwähnt, bald verloren geht, unterscheidet sich von der normalen nicht sehr stark.

Es fehlt ihr die bei der letzteren vorhandene wellige Verzahnung der Radialwände, und sie enthält reichlicher Chlorophyll. Spaltöffnungen sind in beiden Eällen in großer Anzahl vorhanden. Besondere Veränderungen scheinen an ihnen bei der infizierten Frucht nicht stattzufinden, nur sind ihre Zentralspalten stellenweise infolge der starken Spannung weit geöffnet, ferner ist ihre Verteilung auf der Oberfläche eine viel unregelmäßigere. Die Zahl der die Fruchtwand bildenden Zellagen hat in der Regel nicht zugenommen; sie beträgt 4—5, doch sind die einzelnen Zellen bedeutend vergrößert, enthalten viel reichlicher Chlorophyll und stellen so das Nährgewebe des Pilzes in der Frucht dar. Das Leitungssystem ist in der erkrankten Frucht viel stärker entwickelt, als in der normalen, und zwar ist sowohl die Zahl der Bündel, welche in der Fruchtwand verlaufen, eine größere, als auch die Zahl der Elemente in den Bündeln sehr vermehrt. Im übrigen sind Leptom und Hadrom ziemlich gleich stark ausgebildet und zeigen keine besondere Abweichung vom Normalen. Die Gefäße sind insgesamt verholzt (Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion), die mechanischen Elemente aber, welche normalerweise die Gefäßbündel beiderseits begleiten, fehlen gänzlich. — Die weitgehendsten Veränderungen zeigt die Epidermis der Innenseite. Sie besteht in der normalen Frucht aus sehr langen, prosenchymatischen, ineinander verkeilten Zellen (Taf. I Fig. 15). Am Querschnitt sieht man, daß diese allseits stark verdickte Membranen besitzen (Taf. I Fig. 16). Die letzteren färben sich mit Chlorzinkjod braun, reagieren auf Phloroglucin-Salzsäure nicht, färben sich aber mit schwefelsauerm Anilin rötlichgelb, was auf beginnende Verholzung schließen läßt. Diese Zellen überziehen in gleicher Ausbildung die ganzen Innenwände, sie sind nirgends von Spaltöffnungen unterbrochen und dienen jedenfalls mechanischen Zwecken, wahrscheinlich dem Aufspringen der Frucht. — Ganz anders sieht die Innenwand infizierter Früchte aus. Betrachtet man Oberflächenschnitte, so findet man, daß die Epidermis aus großen, unregelmäßig angeordneten Zellen besteht, welche nicht mehr langgestreckt, sondern allseits ziemlich gleichmäßig entwickelt sind. Was aber besonders auffällt, ist, daß die ganze Epidermis sehr zahlreiche Spaltöffnungen trägt, welche in ihrem Bau von den auf Capsella sonst auftretenden sich nicht unterscheiden (Taf. I Fig. 17). Sie enthalten in großer Menge Stärke, und es spricht nichts gegen ihre Funktionstüchtigkeit. An Querschnitten (Taf. I Fig. 18) sieht man, daß die Epidermiszellen jetzt sehr weitlumig sind und nur ihre Außen-

wände stärkere Verdickung zeigen; sämtliche Wände geben jetzt Zellulosereaktion.

Die auffälligen Veränderungen der Früchte ergeben sich insgesamt aus dem Funktionswechsel, den der Pilz veranlaßt. Das Auswachsen der Früchte dient, wie erwähnt, zur Schaffung einer größeren Oberfläche, an welcher Conidien gebildet werden können, die Anlage eines Nährgewebes und zahlreicher Leitungsbahnen zur Versorgung des Parasiten mit Nährstoffen und Wasser. Da der Pilz alle Stoffe für sich beansprucht, kommt es begreiflicherweise überhaupt nicht zur Bildung der Samenanlagen. Was die innere Epidermis betrifft, so hat sie alle mechanischen Charaktere eingebüßt. Ein Aufklappen der Früchte wäre ja jetzt, wo die Samenbildung unterbleibt, ganz zwecklos und findet auch tatsächlich niemals statt. Dagegen wird es für den Pilz sehr vorteilhaft sein, wenn eine andere Funktion der Epidermis in den Vordergrund tritt, nämlich die, als Wassergewebe zu fungieren. Denn der Verlust der äußeren Epidermis bedeutet einen sehr starken Transpirationsverlust, der wohl durch die erhöhte Zahl der Wasserleitungsbahnen zum Teil wieder ausgeglichen wird, es aber trotzdem günstig erscheinen läßt, wenn auch ein wasserspeicherndes Gewebe ausgebildet wird. Und in der Tat sind die inneren Epidermiszellen der infizierten Frucht durch ihren großen Zellsaftraum und die Zartheit ihrer Radialwände befähigt, an das angrenzende Nährgewebe unter Umständen Wasser abzugeben. Von großem Interesse ist das Neuauftreten von Spaltöffnungen. Man kann daraus ersehen, daß das Idioplasma der Zellen des Protoderms, obwohl im Laufe der phylogenetischen Entwicklung die Ausbildung von Spaltöffnungen unterdrückt wurde, die Fähigkeit zur Bildung derselben nicht verloren hat, vielmehr imstande ist, solche auf einen vom Parasiten ausgehenden Reiz hin neuerdings zu entwickeln. In welcher Weise hier das Auftreten von Spaltöffnungen zu deuten ist, läßt sich schon deshalb schwer entscheiden, weil man die Gründe nicht kennt, die in der normalen Frucht zu ihrer gänzlichen Unterdrückung geführt haben. Ich glaube nicht, daß sie unmittelbar für den Parasiten angelegt werden, denn dieser hätte auch ohne sie in der Frucht gerade so viel Luft wie in der Achse. Vielleicht hängt aber ihre Anlage korrelativ mit dem Auswachsen und Vergrünen der Fruchtblätter und deren Funktionswechsel zusammen. — Eine ähnliche Erscheinung beobachtete Molliard (II) an Hemipteren-Blattgallen, daß nämlich »auf der gereizten Fläche des Blattes die Spaltöffnungen mehr oder minder vollständig verschwinden,

dafür unter Umständen auf der andern Seite des Blattes auftreten, auch dann, wenn diese unter normalen Verhältnissen völlig frei von Spaltöffnungen bleibt«[1]).

Schließlich sei bemerkt, daß die in der normalen Pflanze häufigen Sphärokristalle, welche nach den Untersuchungen von Mika, Hansen und Schaarschmidt aus einem dem Hesperidin nahestehenden Stoffe bestehen[2]), sich in der infizierten Pflanze in gleicher Menge finden.

Zusammenfassung.

1. Überall, wo der Pilz zur Anlage der subepidermalen Conidienlager schreitet, kommt es zur Ausbildung eines lebhaft assimilierenden Nährgewebes.

2. Das interzelluläre Mycel entsendet in die Zellen des Wirtes Haustorien, welche zunächst als feine Fortsätze die Membranen durchbohren, dann zu einem kugeligen Köpfchen anschwellen, welches den Protoplasten der Wirtzelle einstülpt, aber niemals verletzt. Bei der Bildung der Conidienträger werden die in die Epidermis eingedrungenen Haustorien durch das Wachstum des Pilzes selbst abgerissen. Sie sterben nun ab und werden vom Plasma der noch lebenden Epidermiszellen aus mit Zellulosehüllen umgeben. In gleicher Weise werden die absterbenden Haustorien im Nährgewebe nachträglich in Zellulose eingeschlossen. Diese Zellulosebildung ist eine Schutzmaßregel der Wirtzelle gegen den Parasiten.

3. Das Aufbrechen der Conidienlager erfolgt dadurch, daß die Zellen der Epidermis am Scheitel der Blase absterben, wobei (vielleicht unter dem Einfluß des Pilzes) eine Verschleimung der Mittellamellen und große Quellbarkeit der Membranen eintritt. Bei Wasserzutritt erfolgt plötzliche Verquellung, und die durch die Volumzunahme der Zellen herbeigeführten Spannungen, in Verbindung mit der schon vorhandenen, führen zum Zerreißen des Gewebes an der schwächsten Stelle, d. i. an den verschleimten Mittellamellen. Die Trennung der Zellen erfolgt also nach den Zellgrenzen. Der beschriebene Vorgang bildet eine für die Verbreitung der Conidien des Pilzes sehr zweckmäßige Einrichtung.

---

1) Zitiert nach dem Referat von Küster in Botan. Centralbl., Bd. LXXXIII, 1900, S. 203.

2) Siehe H. Solereder, Systematische Anatomie der Dicotyledonen. Stuttgart 1899, S. 71.

4. Nach Beendigung der Conidienbildung wird am Stengel von Wirt und Pilz gemeinsam ein Vernarbungsgewebe gebildet, welches die Funktionen der verloren gegangenen Epidermis übernimmt und daher als sekundäres Hautgewebe bezeichnet werden kann. Es besteht aus den abgestorbenen und cutinisierten äußeren Rindenzellen, sowie den Conidienträgern des Pilzes, welche dickwandig werden, und deren plasmatischer Inhalt fettig degeneriert. Dieses Vernarbungsgewebe ermöglicht ein Weiterwachsen der Achse und damit ein Fortschreiten der Pilzinfektion nach aufwärts.

5. Die Veränderungen der Früchte sind sehr weitgehend. Für die Ernährung des Parasiten wird ein stark assimilierendes Nährgewebe sowie eine große Zahl neuer Gefäßbündel angelegt, welche sich von den normalen nicht wesentlich unterscheiden, und deren Gefäße verholzt sind. Die innere Epidermis, welche normalerweise aus prosenchymatischen, mechanischen Zellen besteht, kommt infolge Funktionswechsels als Wassergewebe zur Ausbildung. Während sie im ersten Falle nirgends von Spaltöffnungen unterbrochen wird, treten solche an der erkrankten Frucht sehr zahlreich auf.

6. In der Infloreszenzachse unterbleibt die Verholzung der primären Markstrahlen. Dadurch wird es dem Pilze möglich, durch dieselben bis in das Mark einzudringen.

7. Kernveränderungen wurden sowohl im Nährgewebe als in der abgehobenen Epidermis beobachtet. In beiden Fällen findet eine bedeutende Größenzunahme statt. Im Nährgewebe kommt es zu Lappung, Segmentierung und Amitose der Kerne. Die Nucleolen sind von breiten Höfen umgeben. Im zweiten Falle findet eine periphere Chromatinanhäufung statt.

Exoascus amentorum
(E. Alni incanae)
auf
Alnus incana.

Dieser Pilz befällt die weibliche Infloreszenz der Erle und verursacht hier ein Auswachsen der Deckschuppen und der Früchte zu eigentümlichen, vielfach gewundenen und gefalteten Gebilden. Sadebeck beschäftigte sich nur mit dem Pilze selbst, Smith schloß die Untersuchung von Infloreszenzen von vornherein aus seiner Arbeit

aus, nur von Wakker stammen Angaben über die anatomischen Veränderungen, welche dieser Parasit an seiner Wirtpflanze hervorruft. Doch hielt er alle auftretenden Neubildungen für deformierte Deckschuppen, verwendete aber zu seinen Untersuchungen — wie aus einigen Bemerkungen unzweifelhaft hervorgeht — gerade deformierte Früchte. Natürlich verlieren dadurch die Resultate, die er aus dem Vergleiche mit normalen Deckschuppen erhält, ihren Wert. Wakkers Irrtum verbreitete sich dann auf die spätere Literatur, findet sich z. B. bei Tubeuf u. a.

Wenn man an einer zum Teil erkrankten Infloreszenz die Schuppen von obenher nacheinander ablöst, so findet man, daß einer infizierten und ausgewachsenen Deckschuppe wie jeder andern zwei Früchte aufliegen, welche selbst gleichfalls vom Pilze befallen, oder aber normal sein können. Andererseits können die Früchte infiziert sein, ohne daß es die Deckschuppen sind. Letztere bestehen bekanntlich aus den Tragblättern, welche mit vier Vorblättern zu einem kompakten Gebilde verwachsen sind. Dem entspricht auch der Gefäßbündelverlauf: der Querschnitt durch die Mitte der Schuppe (Taf. I Fig. 19) zeigt fünf Gefäßbündel, deren jedes sich weiter oben in mehrere auflöst. Im übrigen bestehen die Schuppen aus einem eigentümlich maschenförmig angeordneten Parenchym, welches von zahlreichen Interzellularen durchsetzt wird; hin und wieder finden sich kleine Drusen von oxalsauerm Kalk. Die oberflächlichen Zellschichten enthalten Chlorophyll, die Epidermis ist wellig verzahnt und besitzt Spaltöffnungen. Die infizierten Schuppen weichen zunächst durch ihren morphologischen Bau von den normalen ab. Sie übertreffen die letzteren mehrmals an Größe, und es kommen an ihnen die einzelnen Blätter zum Teil zu freier Entwicklung. Während sich nämlich an der normalen Schuppe die Enden der einzelnen Blätter nur als schwach vorspringende Höcker zu erkennen geben, löst sich die infizierte an ihrem Ende häufig in fünf mehr oder weniger deutlich ausgebildete Zipfel auf, welche dann schraubig gewunden oder eingerollt sind (Taf. II Fig. 1). Diese Gebilde bestehen aus einem ziemlich fest gefügten Parenchym von rundlichen Zellen, die in großer Menge Stärke enthalten. Letztere wird wohl nur in den peripheren Schichten durch Assimilation gebildet, die Hauptmasse derselben wird jedenfalls zugeleitet. Drusen von oxalsauerm Kalk treten sehr häufig auf; sie sind viel größer als im Parenchym der gesunden Schuppe. Der Gefäßbündelverlauf ist vom normalen nicht wesentlich verschieden, doch hat die Zahl der leitenden

Elemente um ein bedeutendes zugenommen. Die letzteren sind zum Teil weitlumiger, zeigen aber keine besonderen Abweichungen vom normalen Bau, die Gefäße färben sich bei Behandlung mit Phloroglucin-Salzsäure schön rot (Taf. I Fig. 20). Die Epidermis hat die wellige Verzahnung der Radialwände verloren. Die Ausbildung von Spaltöffnungen scheint gänzlich unterdrückt zu werden, ich konnte solche an keinem Teile der infizierten Schuppen finden.

Die Veränderungen der Früchte sind ganz ähnlicher Natur. Auch diese bestehen normalerweise aus dem beschriebenen maschigen Parenchym und enthalten Kristalldrusen von oxalsauerm Kalk. Die Frucht ist geflügelt (Taf. I Fig. 21), sie ist zweifächrig, doch nimmt das eine Fach, in welchem sich der Same entwickelt, fast den ganzen Raum ein. Das in die Frucht eintretende Gefäßbündel verläuft in der Scheidewand. An der Basis zweigen zwei sehr kleine Bündel ab, die die Flügel der Frucht durchziehen. Die Fruchtwand besteht aus wenigen Zellagen. Zwischen diesen verläuft ein von den seitlichen Gefäßbündeln ausgehender Sklerenchymgürtel, welcher von einer Zellschicht mit Kalciumoxalat-Einzelkristallen begleitet wird. Sowohl die Epidermis der Außenseite als auch die der Innenseite ist verzahnt (Taf. II Fig. 3), erstere durch ein Netz von Cuticularleisten verstärkt. Spaltöffnungen fehlen beiden gänzlich. — Die erkrankte Frucht ist ein sackartiges, runzliges Gebilde (Taf. II Fig. 1), das bis 15 Mal so lang werden kann wie die normale. Auch sie enthält zwei Fächer, von denen eines sehr klein bleibt, während das andere als große Höhlung den ganzen mittleren und oberen Teil der Frucht einnimmt. Es ist dies deshalb auffällig, weil Samenanlagen überhaupt nicht zur Entwicklung kommen. Anatomisch ist sie ähnlich gebaut wie die infizierte Deckschuppe. Auch sie besteht im wesentlichen aus einem stärkereichen Parenchym, in welchem sich große Kristalldrusen finden. Die Frucht ist nicht mehr geflügelt, an Stelle der zwei kleinen Bündel treten nun jederseits 1—3 Gefäßbündel auf, welche aus einer sehr großen Zahl von Leptom- und Hadromelementen bestehen. Der Sklerenchymgürtel und die erwähnte kristallführende Zellschicht sind verschwunden. Die Fruchtwand besteht aus mehreren Lagen des beschriebenen Parenchyms und wird von zahlreichen Gefäßbündeln durchzogen (Taf. I Fig. 22). In diesen ist ein deutliches Vorherrschen des Leptoms bemerkbar (Taf. II Fig. 4). Für die die Gefäßbündel der infizierten Frucht zusammensetzenden Elemente gilt das bei den Deckschuppen Gesagte. Die äußere Epidermis gleicht der der Deckschuppen

vollkommen. Auch die innere besitzt einen ähnlichen Bau, doch sind ihre Zellen größer und inhaltsärmer, jedoch nicht so deutlich als Wassergewebe ausgebildet wie bei Capsella. Dagegen treten auch hier auf der Innenseite Spaltöffnungen auf, sie finden sich aber sehr spärlich und fehlen oft auf große Strecken ganz. Sie gleichen den auf den normalen Deckschuppen auftretenden, nur sind ihre Zentralspalten meist weiter geöffnet (Taf. II Fig. 2).

Das Mycelium des Pilzes lebt subcuticular. Es überzieht die ganze Oberfläche der infizierten Schuppen und Früchte. Dadurch, daß es dieselben zum Auswachsen und zu zahlreichen Faltungen veranlaßt (Taf. I Fig. 20 u. 22), wird auch hier eine bedeutende Oberflächenvergrößerung erzielt, die es dem Pilz ermöglicht, eine viel größere Zahl von Asken zu bilden. Das ganze Parenchym der so entstandenen Gebilde ist ein Stoffspeicher für den Parasiten, aus welchem er seine Baustoffe und das nötige Wasser bezieht. Sobald der Pilz zur Ascusbildung schreitet, was in Frucht und Schuppe in ganz gleicher Weise erfolgt, wachsen die Schläuche zunächst gegen das Innere des entsprechenden Pflanzenteiles, indem sie die Radialwände der Epidermis spalten. Allem Anscheine nach verhindert die Cuticula ein sofortiges Durchbrechen nach außen. In den Epidermiszellen zeigt sich dann folgende Erscheinung. Der Zellkern liegt in der Mitte der Zelle in einer diese quer durchsetzenden Plasmaplatte (Taf. I Fig. 23). Letztere zeigt anfänglich die feinkörnige Struktur des übrigen Plasmas, wird aber bald homogen und stärker lichtbrechend. Diese Platte durchzieht dann im Querschnitte die Zelle von Wand zu Wand, setzt sich aber nicht in die Membran, sondern in den protoplasmatischen Wandbeleg derselben fort. Auch zeigt ihr chemisches Verhalten, daß es sich nicht um Zellulose handelt. Die Substanz färbt sich mit Chlorzinkjod braun und wird von Eau de Javelle in kurzer Zeit völlig aufgelöst. Die Zellen sind dann sehr plasmaarm, der Kern ist nicht mehr ersichtlich zu machen. Es hat den Anschein, daß er in der Bildung der Platte aufgeht; wenigstens lassen sich inhaltsarme Kerne hin und wieder in den schon homogen gewordenen Platten auffinden. — Sobald die Asci energisch in die Länge zu wachsen beginnen, sprengen sie, meist über größere Strecken gleichzeitig, die Cuticula. Es muß nun die Bildung der Ascosporen sehr rasch erfolgen, weil die peripheren Zellschichten des Wirtes infolge des großen Transpirationsverlustes sehr bald zugrunde gehen.

Zusammenfassung.

1. Der Pilz befällt sowohl die Deckschuppen der weiblichen Infloreszenz als auch die Früchte selbst und veranlaßt beide zu außergewöhnlichem Wachstum.

2. Die Neubildungen bestehen der Hauptsache nach aus einem stärkereichen Parenchym, welches dem Pilze als Nährgewebe dient.

3. In allen Gefäßbündeln hat die Zahl der Elemente bedeutend zugenommen, in der Fruchtwand treten zahlreiche neue Bündel auf. Besondere Abweichungen vom normalen Bau konnte ich nicht auffinden. Die Sklerenchymbildung wird in der Frucht unterdrückt.

4. Der äußeren Epidermis fehlt in der erkrankten Frucht und Schuppe die wellige Verzahnung. Ihre Flächenausdehnung wird durch das Auswachsen und die Faltungen der erkrankten Organe bedeutend vergrößert, wodurch dem subcuticular lebenden Pilze die Möglichkeit einer erhöhten Ascusbildung verschafft wird. In den Epidermiszellen entsteht eine »Querplatte« parallel zur Oberfläche in der Mitte der Zellen, in deren Bildung der Zellkern aufzugehen scheint.

5. In der gleichfalls unverzahnten inneren Epidermis der Fruchtwand treten hin und wieder Spaltöffnungen auf, welche normalerweise gänzlich fehlen.

Ustilago Maydis
auf
Zea Mays.

1. Literatur.

Die auffälligen Veränderungen, welche dieser Brandpilz an seiner Wirtpflanze hervorruft, waren bereits Gegenstand wiederholter Untersuchung. Auch hier war es zunächst der Pilz, dem man seine Aufmerksamkeit zuwendete. Fischer von Waldheim, später Wolff und vor allem Brefeld legten seinen Entwicklungsgang klar. Tubeuf gibt eine ausführliche, durch zahlreiche Abbildungen illustrierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen, welchen die Maispflanze unter dem Einflusse des Pilzes unterliegt. Wakker und Knowles endlich beschäftigten sich mit der Untersuchung des anatomischen Baues der infizierten Pflanzenteile. Strohmeyer beschränkt sich darauf, die Angaben Wakkers zu bestätigen.

Wakker gibt Abbildungen eines Querschnittes und eines Längsschnittes eines Stengelteils in der Nähe der Sporenagglomerate, »weil eine Beschreibung allein unmöglich eine richtige Idee geben kann der sonderbaren Verzerrungen, welche die Gefäßbündel erlitten haben«. »Zumal aus der Figur des Längsschnittes«, fährt er fort, »erhellt es, wie die Xylemelemente, deren Wände nicht verholzt sind, unvollkommen geblieben sind und einen geschlängelten Verlauf haben, während ich normal ausgebildete Siebgefäße gar nicht beobachten konnte. — Das umgebende Parenchym ist sehr reich an Stärke. An den Stellen, wo sich später die Sporenmassen ausbilden werden, erleiden die schon erwachsenen Parenchymzellen mehrfache Quer- und Tangentialteilungen, durch welche ein Nährgewebe entsteht. Es bildet zahlreiche Gefäßbündel, deren Elemente noch kleiner und unregelmäßiger sind, als die bereits abgebildeten, und wird bald von den Hyphen zerstört.«

Knowles kam nach der Zusammenfassung, welche Smith in seiner früher genannten Arbeit (S. 424) gibt, zu folgenden Ergebnissen: »Dort, wo Sporenbildung erfolgt, findet eine auffallende Hypertrophie statt. Die mikroskopische Untersuchung derselben zeigt die Spaltöffnungen unregelmäßig verschoben. Die Zellengewebe des Stengels, besonders die peripheren Zellen, sind zwar kleiner, aber viel zahlreicher, mit dünnen Wandungen und vermehrtem Zellinhalt; die Gefäßbündel sind zerrissen und so verändert, daß Phloem und Xylem schwer zu unterscheiden sind.«

Wie man sieht, geht aus den bisherigen Arbeiten nicht viel mehr hervor, als daß der Gefäßbündelbau Störungen erleidet, daß neue Bündel angelegt werden, ein parenchymatisches Nährgewebe zur Ausbildung kommt und die Anordnung der Spaltöffnungen eine unregelmäßige ist. Alle diese Punkte waren einer genaueren Untersuchung zu unterziehen. Bevor ich aber auf die Veränderungen der Gewebe zu sprechen komme, will ich einiges über das Wachstum des Pilzes in der Wirtpflanze und das Verhalten der infizierten einzelnen Zelle mitteilen. Letzteres bildet in mancher Hinsicht einen interessanten Beitrag zur Pathologie der pflanzlichen Zelle und gestattet insbesondere Schlüsse auf die Funktion des Zellkernes.

2. Der Pilz und die Wirtzelle.

Wie bekannt, findet die Gallenbildung an den verschiedensten Teilen der Maispflanze statt. Meine Untersuchungen haben mir

gezeigt, daß die Wirtpflanze in recht verschiedener Weise auf den vom Parasiten ausgehenden Reiz zu reagieren vermag. Es können auch die gleichen Gewebe und die sie zusammensetzenden Zellen von Fall zu Fall ein verschiedenes Verhalten zeigen, für welches vor allem ihr Alter zur Zeit der Infektion, dann der Ort der Sporenbildung und die Größe der ausgebildeten Sporenmassen maßgebend ist. Dieser Umstand legt es nahe, anzunehmen, daß die pathologischen Veränderungen auch je nach dem Teile der Pflanze, an welchem die Infektion bzw. Sporenbildung auftritt, verschieden sein können. Ich halte es daher für angezeigt, gleich jetzt einige Bemerkungen über das Material vorauszusenden, auf welches sich meine Untersuchungen beziehen. Es war dies eine vom normalen Bau gänzlich abweichende weibliche Infloreszenz, welche in Alkohol konserviert worden war. An Stelle des Kolbens war ein unförmlicher weißlicher Klumpen vorhanden, an dem es überhaupt nicht zur Körnerbildung gekommen war. Die Hüllblätter waren gleichfalls infiziert und zeigten an ihrer Außenseite Beulen von verschiedener Größe. Nur an den äußeren Hüllblättern waren diese aufgebrochen und an den Rißstellen gebräunt; die Mehrzahl derselben war, wie auch der Kolben, in noch jugendlichem unverletzten Zustande. Durch das weißliche, an der Oberseite glänzende Gewebe schimmerten die braunen Sporenmassen des Pilzes. Das Alter der infizierten Teile war für die Untersuchung gerade günstig. Es fanden sich bereits alle Entwicklungsstadien des Pilzes, doch war es noch nicht zu einer gänzlichen Zerstörung der Gewebe der Wirtpflanze gekommen.

Der Lebensgang des Pilzes kann als bekannt vorausgesetzt werden. Der eingedrungene Keimschlauch wächst zu einem Mycel aus, welches intrazellulär die Zellen durchsetzt. Vielfach kommt es aber auch — was bisher übersehen wurde — zu interzellulärem Wachstum, wovon später noch die Rede sein soll. Diejenigen Hyphen, welche die von Zelle zu Zelle fortschreitende Infektion bewirken, nehmen einen im großen ganzen geradlinigen Verlauf, der sich oft durch viele Zellen verfolgen läßt. Querwände sind in diesen Hyphen nur selten zu finden; letztere sollen, da sie vor allem der Verbreitung des Pilzes in der Wirtpflanze dienen, im folgenden kurz als Verbreitungshyphen bezeichnet werden. Von ihnen zweigen innerhalb der Wirtzellen einzeln oder in Büscheln kurze, vielfach verzweigte und gekrümmte Hyphen ab. Diese sind reichlicher septiert, plasmareich und fungieren, wie schon Wolff angenommen hat, zweifellos als Haustorien. Durch die Verzweigungen und

Krümmungen kommt eine bedeutende Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche zustande, welche eine intensive Ausnützung der Wirtzelle gestattet. Bezüglich der Sporenbildung verweise ich auf die Ausführungen Brefelds. Wo das vegetative Mycel sich zu dieser anschickt, verzweigt es sich reichlich innerhalb der Zellen. Das ganze fettreiche Plasma der sporenbildenden Hyphen zerfällt durch Querwände in zahlreiche kleine Portionen. Hierauf verquellen die Membranen des Pilzes zu einer gallertigen Masse, welche kugelige Klumpen bildet, in denen die Sporen zur Entwicklung kommen, wobei die Gewebe des Wirtes verdrängt werden.

Wie schon Fischer von Waldheim gefunden hat, ist das vegetative Mycel des Pilzes in der Wirtpflanze zum Teil von Zellulosescheiden umgeben. Diese Erscheinung wurde von ihm außer bei Ustilago Maydis noch bei U. Carbo, ferner bei Urocystis occulta und Saponariae beobachtet. Er erklärte die Scheide für eine unmittelbare Fortsetzung der Membran der Wirtzelle, da ihre Schichten in die der letzteren übergehen. Auch Wolff waren diese Bildungen aufgefallen, er stellt sie weiter für Ustilago destruens, sowie Tilletia Caries und T. laevis fest und schreibt darüber (S. 20): »Es tritt dabei der eigentümliche Umstand ein, daß der Faden, sobald seine Spitze in das Innere der Zelle tritt, nicht frei in dieses hineinwächst, sondern von den inneren Schichten der Zellwand, welche sich gleichsam ausstülpen, wie in eine Scheide von bald größerer, bald geringerer, oft sehr beträchtlicher Stärke eingeschlossen wird, und in dieser bis zur nächsten Zellwand weiterwächst«. Webber beobachtete dieselbe Erscheinung an dem Wurzelpilze von Juncus bufonius, Solms-Laubach bei Ustilago Treubii. Brefeld hat sie — wenigstens in seinen »Brandpilzen«. — nicht richtig gedeutet. In seinen Abbildungen sind die Scheiden ohne weiteres zu erkennen, doch hält er sie nicht für Bildungen der Wirtzelle, sondern des Pilzes selbst (Bd. XI S. 33/34 für Ustilago Avenae, S. 48 für U. cruenta und S. 76—79 für U. Maydis). Den Autoren, welche sich mit der Anatomie der Brandbeulen von Zea Mays beschäftigten, scheint die Scheidenbildung entgangen zu sein.

Die Zellulosescheiden entstehen bei Ustilago Maydis — wie wohl überall — gleich beim Eindringen des Pilzes. Ihre Bildung geht dabei jedenfalls in derselben Weise vor sich, wie ich sie beim weiteren Wachstum des Pilzes in den Geweben der Wirtpflanze beobachten konnte. Sie kommt in typischer Weise ausschließlich an den von mir als Verbreitungshyphen bezeichneten Teilen des Pilzes

zustande, wobei sich regelmäßig folgender Vorgang abspielt. Sobald eine Verbreitungshyphe in eine neue Zelle einzudringen beginnt, wandert der Kern der letzteren an die Eindringungsstelle und legt sich ihr fest an (Taf. II Fig. 5). Es wird also durch die Hyphe ein Reiz auf den Protoplasten ausgeübt, der jedenfalls als traumatisch bezeichnet werden kann; es schließt das nicht aus, daß er vielleicht chemischer Natur ist, in welchem Falle die Bewegung des Kernes als eine chemotaktische anzusehen wäre. Es hat auch Leitgeb gezeigt, daß ein parasitischer Pilz schon durch die Membran der angegriffenen Zelle auf das Plasma derselben wirken kann. Er schreibt für Completoria complens: »Der Angriff auf die Nährzelle macht sich dadurch erkennbar, daß die Chlorophyllkörner von der Berührungsstelle zurückweichen und hier die Membran sich zu bräunen beginnt«. Eine traumatrope Bewegung des Kernes beobachtete ferner Němec bei Calyptogeia trichomanis, wo die Zellkerne sich gegen die Stellen bewegen, an welchen die Haustorien des Mycorrhizapilzes eindringen. — In unserem Falle kommt es nun zu einer lebhaften Zellulosebildung, und zwar nur an der gereizten Stelle, welcher der Zellkern anliegt. Die derart entstehende Zellulose ist jedenfalls ein Umwandlungsprodukt der Hautschicht des Protoplasten, welches von dieser unter unmittelbarer Mitwirkung des Kernes gebildet wird. In dieses Zellulosepolster wächst nun die Hyphe hinein, und es kommt zu einem Kampfe zwischen Pilz und Wirtzelle, in welchem ersterer zelluloselösend, letztere zellulosebildend wirkt. Dabei wächst die Hyphe mit der sie umgebenden Hülle immer weiter gegen das Innere der Wirtzelle zu. Wie die anfängliche Membrandurchbohrung lehrt, wird der zelluloselösende Stoff vom Pilze vor allem an der Spitze der Hyphe ausgeschieden; hier muß also die Wirtzelle die größten Anstrengungen machen, um gegen den Parasiten aufzukommen. Das geschieht derart, daß der Kern an der Spitze des Gebildes gegen das Zellinnere wandert. Es wird dabei der Protoplast der Wirtzelle eingestülpt, anscheinend unter Neubildung bzw. Vermehrung von Plasma. In vielen Fällen zieht nun die Wirtzelle für eine Zeitlang insofern den kürzeren, als ihre zellulosebildende Tätigkeit dem Wachstum der Hyphe nicht Schritt zu halten vermag. Diese wächst über den Kern hinaus, durchdringt die Hülle und kommt so mit dem Protoplasten in direkte Berührung. Letzterer wird aber nicht durchbohrt, vielmehr immer weiter eingestülpt, bis die gegenüberliegende Zellwand erreicht ist. Der Kern folgt in diesen Fällen der Hyphenspitze in einiger Entfernung nach und beteiligt sich augenscheinlich

an der weiteren Bildung der Scheide. Diese reicht nämlich in gleichmäßiger Dicke bis zum Kerne und verliert sich über ihn hinaus allmählich im Plasma (Taf. II Fig. 6). In andern Fällen aber kommt die Hyphe tatsächlich während ihres ganzen Wachstums durch eine Zelle nicht mit dem Plasma derselben in Berührung; die Zellulosescheide umgibt sie, bis sie die gegenüberliegende Membran erreicht. Dort legt sich die Scheide an die Zellwand an und wird mit dieser durch neu angelagerte Zellulose verbunden. Im fertigen Zustande sind die beiden Fälle nicht mehr zu unterscheiden. Denn schließlich wird auch im ersten Falle die Scheide bis zur gegenüberliegenden Membran ausgebildet, so daß sie die Zelle als eine Röhre, in welcher der Pilz verläuft, durchzieht (Taf. II Fig. 7 u. 8). In jenen Fällen endlich, wo das Gewebe der Wirtpflanze schon erstarkt ist, wird so viel Zellulose ausgeschieden, daß der Hyphe ein Weiterwachsen unmöglich gemacht und an dieser Stelle ein Fortschreiten der Infektion verhindert wird. An diesen auffallend dicken Scheiden, deren Durchmesser den der Hyphe bedeutend übertreffen kann, ist dann meist eine deutliche Schichtung bemerkbar (Taf. II Fig. 9).

Wie wir gesehen haben, kommt es vor, daß die Hyphe ihre Wirtzelle verläßt, ohne mit dem Protoplasten derselben in Berührung gekommen zu sein. Anders liegt es dort, wo es der Hyphe gelingt, die Hülle zunächst zu durchdringen und frei an die gegenüberliegende Zellseite zu gelangen. Hier läßt uns die Beobachtung im Stiche, und eine einfache Überlegung scheint zu der Annahme zu zwingen, daß dann eine Durchbohrung des eingestülpten Protoplasmaschlauches erfolgen müsse. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß eine solche Durchbohrung sonst nirgends zu beobachten ist. Ich möchte mir den Vorgang folgendermaßen vorstellen. Das von dem Plasmabeleg der Wirtzelle umgebene Hyphenende dringt bis zum Plasmabeleg der gegenüberliegenden Zellwand vor, worauf zunächst die inneren und später auch die äußeren Plasmahäute verschmelzen. Bei weiterem Vordringen der Hyphe wird also ihr Ende von der Membran der Wirtzelle nur noch von einer Partie der Plasmahaut getrennt. Diese Partie kann jetzt von der Hyphe durchwachsen werden, ohne daß eine Durchbohrung des Plasmabelegs (einschließlich des Körnerplasmas) zu erfolgen brauchte. Die die Hyphe umgebende Plasmaröhre könnte also mit dem gegenüberliegenden Plasmabelege in ähnlicher Weise in Verbindung treten, wie sonst die Zelluloseröhre mit der Membran. Dadurch würde dem Pilze der Austritt aus dem Protoplasten ohne nennenswerte Verletzung desselben ermöglicht.

Wie schon erwähnt, sind nur die Verbreitungshyphen von diesen kontinuierlichen Scheiden umschlossen, welche sich mit jenen durch die Zellen verfolgen lassen (Taf. II Fig. 7 u. 10). Selten aber setzen die Scheiden zweier benachbarter Zellen an genau gegenüberliegenden Stellen der sie trennenden Membran an; vielmehr kommt es meist dazu, daß die Hyphe eine Zeitlang in der Mittellamelle der letzteren fortwächst, um dann erst in die Nachbarzelle einzudringen (Taf. II Fig. 5). Die Hyphen erscheinen dann in den einzelnen Zellen nahezu parallel verschoben. Oft aber bleibt die Hyphe in der Mittellamelle und wächst dann durch größere Strecken interzellulär. Dieses interzelluläre Mycel ist schwer nachzuweisen, verrät sich aber sofort durch die zahlreichen Haustorien, welche es in das Innere der Zellen entsendet. Durch das interzelluläre Wachstum finden auch jene Fälle ihre Erklärung, welche einem ziemlich häufig entgegentreten und wiederholt abgebildet wurden, wo nämlich eine umscheidete Hyphe an der Membran einer Zelle ein plötzliches Ende zu nehmen scheint. In Wirklichkeit setzt sich von dort aus das Mycel interzellulär fort (Taf. II Fig. 7 u. 8). Man möchte nun erwarten, daß in den Teilen der Gallen, welche unter dem Einflusse des Pilzes in jugendlichem Zustande verharren (wovon später noch zu sprechen ist), das Wachstum des Pilzes hauptsächlich intrazellulär vor sich gehen würde. Denn die zarten Membranen dieser Partien der Wirtpflanze können augenscheinlich dem Pilze nicht jenen Widerstand entgegensetzen, den er an jenen Stellen findet, wo die Gallen an das normale Dauergewebe grenzen und die Membranen ihre endgültige derbe Ausbildung erfahren haben. Trotzdem verhält sich die Sache gerade umgekehrt. Während nämlich im letzteren Falle die Zellen von zahlreichen umscheideten Hyphen durchsetzt werden, ist das Mycel im jugendlichen Gallengewebe hauptsächlich interzellulär. Es lassen sich dafür zwei Gründe ausfindig machen. Einerseits kann man daran denken, daß die jugendlichen Zellwände dem osmotischen Stoffverkehr zwischen Pilz und Zelle einen viel geringeren Widerstand entgegensetzen, als die erstarkten, so daß der Pilz es nicht so nötig hat, in die Zellen selbst einzudringen, andererseits ist es für den Pilz vielleicht schwieriger, die Mittellamellen der fertigen Zellwände zu lösen, als diese selbst zu durchbohren.

Interessante Verhältnisse zeigt auch die erkrankte Infloreszenzachse. Hier findet man nämlich Hyphen, welche in die Gefäßbündel eindringen und die großen Gefäße durchsetzen. Letztere waren in den untersuchten Teilen zu ganz normaler Ausbildung gekommen.

Die in sie eingedrungenen Hyphen waren mit besonders dicken Scheiden umgeben, welche sich beiderseits in die Gefäßwand fortsetzten (Taf. II Fig. 11). Während diese aber mit Phloroglucin-Salzsäure deutliche Holzreaktion gibt, färbt sich die Hülle damit gar nicht, wohl aber — wie alle andern — mit Chlorzinkjod schön violett. Diese Erscheinung kann wohl nur derart erklärt werden, daß die Hyphe noch vor dem Absterben der die Gefäße bildenden Zellen in diese eingedrungen war und später bei der starken Verdickung der Wände von dem noch lebenden Protoplasten mit Zellulose umhüllt wurde. Gegen die später eintretende Verholzung scheint sich der Pilz mit Erfolg gewehrt zu haben. In den Zellen des Holzparenchyms waren dieselben Hyphen auffallenderweise nicht umscheidet. Diesen Zellen scheint also die Fähigkeit der Zelluloseneubildung zu fehlen.

Wir haben uns nunmehr eingehender mit den Zellkernen der infizierten Zellen zu beschäftigen, welche ihr normales Aussehen nicht behalten, sondern mehr oder minder starke Veränderungen erleiden. Diese sind am weitgehendsten und auffallendsten in dem schon früher erwähnten Grenzgebiet zwischen Galle und normalem Gewebe und lassen sich am besten in den Epidermiszellen der Innenseite der Hüllblätter studieren. Das jugendliche, unter dem Einflusse des Pilzes zur Entwicklung gekommene Gallengewebe, welches, wie noch später zu betonen sein wird, in jeder Beziehung eine Neubildung darstellt, enthält dagegen fast normale Kerne. — Die Zellkerne der erwähnten Epidermis fallen zunächst durch ihre dunkelgelbe Farbe auf und können ohne jede Tinktion untersucht werden. Eine solche scheint aber überhaupt nicht möglich zu sein, wenigstens erhielt ich mit Boraxkarmin, welches die normalen Kerne sehr schön färbt, ferner mit Methylgrün-Essigsäure negative Resultate, und bei der Doppelfärbung mit Fuchsin-Methylenblau färbten sich nur die Nucleolen rosa. Die Kerne weichen dadurch auffallend von den bisher beschriebenen Kernen infizierter Gewebe ab, für welche durchweg erhöhte Tinktionsfähigkeit angegeben wird. Dabei sind sie aber substanzreich, von feinkörnigem Inhalt erfüllt und mit großen Nucleolen versehen. Die normalen Kerne der Epidermis der Innenseite (Taf. II Fig. 13) besitzen meist kreisrunde Gestalt oder sind auf der einen Seite zugespitzt. Eigentümlich für sie ist, daß regelmäßig mehrere Nucleolen in einem lichten Hofe vereint auftreten, während peripher häufig noch ein einzelner Nucleolus vorhanden ist. Die Kerne des infizierten Gewebes nehmen an Umfang sehr bedeutend zu. Es tritt an ihnen eine auffallende Lappung oder Sprossung ein

(Taf. II Fig. 14), ähnlich wie sie Tischler und Molliard (III) für die Riesenzellen von Heteroderagallen, letzterer (IV) auch für Phytoptusgallen beschrieben haben. Durch diese Lappung entstehen aus den Kernen sehr merkwürdige Gebilde; zu einer eigentlichen »Amitose durch Knospung oder Sprossung«, wie sie Tischler für seine Objekte beschreibt, kommt es aber hier nicht. Dagegen tritt mitunter Segmentierung ein, wodurch ein ganzer Haufen von Kernen gebildet wird, die sich aber allem Anscheine nach nicht trennen. Jedes Segment enthält dann in der Regel einen Nucleolus (Taf. II Fig. 14b), doch treten solche auch in bloß gelappten Kernen häufig in der Mehrzahl auf. Sie scheinen sich durch Teilung zu vermehren (Taf. II Fig. 10), enthalten meist kleine Vakuolen und besitzen nicht selten zipfelförmige Fortsätze (Taf. II Fig. 14a). In einzelnen Fällen beobachtete ich auch Fragmentation von Kernen, welche derart vor sich geht, daß der Kern wiederholt kugelige Gebilde von körnigem Inhalt (ohne Nucleolen) abschnürt, schließlich aber an der Stelle des Abschnürens seine Membran verliert, so daß sein Inhalt in das Plasma ausfließt. — Ähnliche Kernveränderungen finden sich auch in der Infloreszenzachse und im Blattparenchym (Taf. II Fig. 14 *d*) in der Nähe der Gallen. In diesen selbst sind — wie schon erwähnt — die Kerne wenig verändert. Sie lassen sich hier wieder mit Boraxkarmin färben, sind nur selten schwach gelappt, enthalten aber fast ausnahmslos nur einen von einem Hof umgebenen Nucleolus (Taf. II Fig. 15).

Daß die Kernveränderungen, welche vor allem zu einer bedeutenden Oberflächenvergrößerung führen, mit der erhöhten Inanspruchnahme der Zellkerne zusammenhängen, geht aus folgendem hervor. Hat der Kern die Hyphe bis an das Zellende begleitet, und ist die Scheidenbildung vollendet, so kehrt er an der Scheide in deren Mitte zurück. Dabei verändert sich sein Aussehen wesentlich. Die Lappung geht nämlich ganz oder zum größten Teil wieder zurück, d. h. der Kern rundet sich allmählich wieder ab. Ganz das gleiche beobachtete Magnus an den Zellkernen von Neottia nach erfolgter Einhüllung der verdauten Pilzhyphen in Zellulose. Die Kerne sind dann in unserm Falle dem Strang eng angeschmiegt (Taf. II Fig. 7) und von so dichtem Plasma umgeben, daß es kaum möglich ist, ihre Konturen zu erkennen. — Es sind nun noch jene Fälle zu besprechen, in welchen mehrere Verbreitungshyphen eine Zelle durchsetzen. Findet ihr Eindringen nacheinander statt, so kann der Zellkern sich zu jeder neu eintretenden begeben und sich an ihrer Umscheidung beteiligen. Dringen aber mehrere Hyphen auf einmal ein, so hilft sich die Zelle

dadurch, daß der Kern einer Hyphe sich anlegt, mit den übrigen aber durch dichte Plasmastränge in Verbindung tritt. Diese Erscheinung läßt sich übrigens auch im ersten Falle nicht selten beobachten; im zweiten Falle wieder kann es vorkommen, daß der Kern eine intermediäre Stellung zwischen den Hyphen einnimmt und mit jeder durch einen Plasmastrang verbunden ist. Da solche aber auch vom Kerne zu den Haustorien führen (Taf. II Fig. 8), strahlen sie oft von diesem in großer Menge nach allen Richtungen aus. Schließlich ist noch zu bemerken, daß in den seltenen Fällen, wo sich eine Verbreitungshyphe teilt, der Kern an der Stelle der Gabelung liegt.

Bezüglich der umscheideten Hyphen muß noch einer Erscheinung Erwähnung getan werden. Schon Wolff gibt für die von ihm untersuchten Ustilagineen an, »daß nur die mit Plasma versehene Myceliumspitze wachstumsfähig ist; die durch Querwände abgeschlossenen Partien sind abgestorben und nur mit wässeriger Flüssigkeit erfüllt; nur bisweilen sieht man in ihnen bei Anwendung von Jod Reste eines plasmatischen Inhalts«. In der Tat sind die Verbreitungshyphen oft durch große Strecken fast inhaltslos. Ob sie dann wirklich abgestorben sind, will ich dahingestellt sein lassen, sicher ist nur, daß sie die Fähigkeit des Längenwachstums verloren haben, was aus folgendem hervorgeht. Bei der Ausbildung der Scheiden ist das Wachstum der Wirtzelle häufig noch nicht beendet. Wenn diese nun weiterwächst, so hat dies zur unmittelbaren Folge, daß die die Zellen durchsetzenden Stränge mit diesem Wachstum in irgendeiner Weise gleichen Schritt halten müssen, um nicht zu zerreißen. Es kann das derart erfolgen, daß die Stränge gleichfalls in die Länge wachsen, oder dadurch, daß sie passiv gedehnt und ausgezogen werden. Die Beobachtung zeigt nun, daß sich hierbei Scheide und Hyphe verschieden verhalten. Erstere, als ein Teil der lebenden Wirtzelle, ist so lange wachstumsfähig wie diese selbst. Anders liegt es beim Pilz: er kann dem Wachstum seiner Wirtzelle nicht Folge leisten und zeigt deutliche Erscheinungen einer gewaltsamen Dehnung. Seine Hyphen sind in den Zelluloseröhren zu fadenartig dünnen Strängen ausgezogen, die Lumina verschwinden ganz, indem die Wände sich aneinander legen, so daß nun die Hyphe eine homogene, stark lichtbrechende Membranplatte in der Röhre bildet. Bekommt man diese Platte von der Schmalseite zu sehen, so erscheint sie als ein heller, die Röhre durchziehender Faden (Taf. II Fig. 7). Es ist kaum anzunehmen, daß die Hyphen in diesem Zustande noch am Leben sind, und zwar um so weniger, als es bei weiterem

Wachstum der Wirtzelle oft dazu kommt, daß die Hyphen in der Zelluloseröhre zerreißen. In diesen Fällen zeigt die Wirtzelle ein eigentümliches Verhalten. Es wird an den Rißstellen in großer Menge Zellulose gebildet, so daß knopfförmige Verdickungen an der Röhre entstehen, welche gewissermaßen die Rißstelle flicken, um ein gänzliches Zerreißen des Stranges zu verhüten. Nicht selten finden sich mehrere solche Stellen an einem Strange hintereinander (Taf. II Fig. 6 u. 12). Die Verdickungen sind meist von ovaler Gestalt und oft deutlich geschichtet. Chlorzinkjod färbt ihren Kern dunkelviolett, die äußeren Schichten lichter. In einzelnen Fällen war es zu ganz außerordentlichen kugeligen Anschwellungen gekommen. Fig. 10 auf Taf. II stellt einen solchen Fall dar; wie man sieht, lagert hier der Kern der Neubildung eng an.

Es hat sich also gezeigt, daß die Umhüllung der Verbreitungshyphen nicht auf eine Einstülpung der Membran zurückzuführen ist, sondern daß vom Plasma aus, auf den vom Pilz ausgehenden Reiz hin, Neubildung von Zellulose stattfindet, durch welche die Scheidenbildung bewirkt wird. Wichtig ist dabei das Verhalten des Zellkernes: dieser befindet sich stets an der Stelle der stärksten Zellulosebildung; wo dies untunlich ist, steht er mit derselben durch Plasmastränge in Verbindung. Dieser Befund steht in schöner Übereinstimmung mit den Ergebnissen, welche Haberlandt, Townsend, Klebs und Magnus bezüglich der Beteiligung des Kernes an der Membranbildung mitgeteilt haben.

Der eigentliche Zweck der Zellulosebildung liegt wohl darin, daß die Wirtzelle das Eindringen der Hyphe durch sie zu verhindern sucht; wofern dies nicht gelingt, wird dadurch wenigstens das Plasma gegen den Feind abgegrenzt und so dessen schädigende Wirkung abgeschwächt. In gleicher Weise erklärt Němec die Bildung von Zellulose in der Mycorrhiza von Calypogeia und vermutet, daß diese Deutung auch für die von Janse angegebenen Fälle von Zellulosebildung in Mycorrhizen zutreffen dürfte. Wie noch später bei Uredineen und bei Exobasidium zu betonen sein wird, handelt es sich bei dieser Erscheinung um eine ganz allgemeine Schutzmaßregel der Wirtpflanzen gegen intracelluläre Pilzinfektion. Bei den Ustilagineen aber, wo allein die Bildung von Zellulosesträngen erfolgt, welche die ganze Zelle durchsetzen, könnte man in zweiter Linie auch an eine mechanische Funktion derselben denken. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Zelle ein Zerreißen der Stränge stets zu

verhindern sucht und zu diesem Zwecke großen Materialaufwand nicht scheut. Freilich läßt sich dies auch daraus erklären, daß beim Zerreißen infolge des plötzlichen Aufhörens der Spannung ein Auseinanderschnellen der Teile erfolgen würde, das wahrscheinlich eine Schädigung des Protoplasten zur Folge hätte. Immerhin ist es, wie erwähnt, möglich, daß die Stränge auch mechanisch wirksam sind. Vor allem liegt es nahe, anzunehmen, daß sie ein Zerreißen des Gewebes verhindern sollen. Dieses ist durch das Wachstum des Pilzes, besonders bei der Sporenbildung, oft starken Spannungen ausgesetzt. Vielleicht leisten dabei die Zellulosestränge den letzteren wie ein System fester Taue Widerstand. Dafür spricht auch, daß sie besonders in älteren Zellen ausgebildet werden. Diese scheinen einerseits zur Zellulosebildung befähigter zu sein, andererseits haben sie eine mechanische Verstärkung deshalb nötiger, weil sie nicht mehr — wie das jugendliche Gallengewebe — imstande sind, durch Wachstum die Spannungen auszugleichen. Man könnte aber auch, gerade entgegengesetzt, daran denken, daß es sich um eine Versteifungsvorrichtung handelt, welche das gänzliche Kollabieren der Zellen bei ihrem Absterben verhindert, und so dem Pilz als eine Art Capillitium zugute kommt, welches ein Lockerbleiben der Gewebe bewirkt und dadurch ein leichteres Ausstäuben der Sporen ermöglicht. Gegen diese zweite Annahme sprechen die Beobachtungen von Solms-Laubach an Ustilago Treubii; auch dieser Pilz wird, wie schon erwähnt, umscheidet, trotzdem bildet die Wirtpflanze für ihn ein eigenes zelliges Capillitium aus.

Die Haustorien des Pilzes sind in der Regel nicht von Scheiden umschlossen (Taf. II Fig. 8). Nur an den Stellen der stärksten Zellulosebildung, also an den Grenzen der Gallen, werden auch sie, mögen sie nun von intrazellulären oder interzellulären Hyphen ausgehen, in Zellulose eingehüllt. Die Scheide ist dann aber meist an der Spitze vom Haustorium durchbrochen, seltener ist dieses gänzlich überzogen (Taf. II Fig. 9). Wie ohne weiteres zu beobachten ist, wird der Protoplast von den freien Haustorien stets nur eingestülpt und niemals durchbohrt. Der Zellkern liegt den Haustorien nur selten an, dagegen ist er mit ihnen häufig durch Plasmastränge verbunden. Andererseits konnte ich wiederholt beobachten, daß umgekehrt das Haustorium den Kern aufsucht und diesen mit seinen Verzweigungen umfaßt und einbuchtet (Taf. II Fig. 15*a*). Daß wirklich der Pilz den Kern aufsucht, erhellt daraus, daß dieser seine zentrale Lage in der Zelle beibehält. Auch Němec gibt in seiner Arbeit über Calypogeia

an, daß einerseits der Kern sich traumatrop gegen die Infektionsstelle bewege, andererseits die Haustorien des Pilzes mitunter gegen den Kern zu wachsen. Da ich letztere Erscheinung viel auffälliger und regelmäßiger an Puccinia Adoxae beobachtete und sie für Uredineen schon länger bekannt ist, soll sie erst bei diesem Objekt eingehender besprochen werden.

Dort, wo sich das vegetative Mycel in das sporenbildende fortsetzt, geht die Scheide auch auf letzteres über (Taf. II Fig. 12). Sobald aber die Verquellung der Hyphen eine stärkere wird, scheint sie wieder aufgelöst zu werden; wenigstens konnte ich sie dann nicht mehr nachweisen.

3. Die Veränderungen der Gewebe.

Zu den auffälligen Wucherungen in den Geweben der Wirtpflanze kommt es erst bei der Sporenbildung des Pilzes. Es sollen zuerst die Veränderungen der Hüllblätter, dann die des Kolbens besprochen werden.

Die Sporenbildung findet in den Hüllblättern vor allem an der Außenseite, d. i. in dem zwischen den Gefäßbündeln und der äußeren Epidermis gelegenen Gewebe, statt. Nur selten waren auch gegen die innere Epidermis zu kleine Sporenballen zur Entwicklung gekommen. Wie schon öfters erwähnt, sind die Verhältnisse an den Grenzen der Gallen von den in den Gallen selbst herrschenden verschieden. Die letzteren stehen mit ihren Geweben ausschließlich im Dienste des Parasiten. Die hier stattfindenden Wachstumsvorgänge sind als Reaktionen auf den vom Pilze ausgeübten Reiz aufzufassen, während an den Grenzen der Gallen auch Erscheinungen auftreten, die sich rein mechanisch, nämlich durch die übermäßige Spannung der nicht mehr wachstumsfähigen Gewebe erklären. Da die Veränderungen in den Epidermen wesentlich durch die Verhältnisse, die im Innern der Blätter herrschen, bedingt werden, will ich mich zunächst den letzteren zuwenden.

Im normalen Hüllblatt findet man unter der Epidermis der Außenseite eine Lage kleiner isodiametrischer Zellen, welche wenige schwach gefärbte Chlorophyllkörner enthalten. Auf diese kaum als Assimilationsgewebe zu bezeichnende Schicht folgen sieben bis acht Lagen äußerst plasmaarmer Zellen, die fast lückenlos aneinandergrenzen, dann die innere Epidermis. Die das Blatt durchziehenden Gefäßbündel zeigen den für Gramineen typischen Bau. Die größeren

Gefäßbündel besitzen über dem Leptom einen Bastbeleg, die größten auch eine entsprechende Gurtung über dem Hadrom. — Im infizierten Blatte kommt es infolge der Sporenbildung des Pilzes zu einer weitgehenden Vermehrung der Elemente. An dieser beteiligen sich vor allem die erwähnte subepidermale Zellschicht und die Zellen des Parenchyms. Aus ersterer entsteht durch zahlreiche radiale und tangentiale Teilungen ein kleinzelliges Gewebe, dessen Zellen von dichtem trüben Plasma erfüllt sind und relativ große Kerne besitzen. Ich will gleich hier bemerken, daß die äußersten Lagen dieses Gewebes durch tangentiale Teilungen der Epidermiszellen entstehen; sie weichen in ihrem Aussehen in keiner Weise von den darunterliegenden ab. Das Parenchym teilt sich vor allem in tangentialer Richtung. Zwischen den heranwachsenden Sporenballen des Pilzes finden sich dann schlauchartige Zellkomplexe, welche oft aus einer Reihe von 12 oder noch mehr Zellen bestehen, die deutlich ihre Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Mutterzelle erkennen lassen. Das ganze derart aus dem Parenchym entstandene Gewebe enthält reichlich Plasma und Stärke, hat also seinen Charakter völlig verändert. Während die Zellen normalerweise fast nur Zellsaft enthalten, ferner durch die nicht selten zu beobachtende Wellung der zarten Radialwände als Wassergewebe charakterisiert sind, dienen sie jetzt zur Speicherung plastischer Baustoffe. Es hat also ein gänzlicher Funktionswechsel stattgefunden. Im Dienste der Pflanze hatte das Gewebe die Aufgabe, Wassermengen aufzuspeichern, wahrscheinlich um den eingeschlossenen Kolben vor Austrocknung durch zu starke Transpiration zu schützen. Jetzt aber wird es vom Pilze zur Lieferung von Reservestoffen gezwungen.

Ganz analoge Veränderungen zeigt der Gefäßbündelbau. In dem angeschwollenen Teile des Blattes kommt das Hadrom überhaupt nicht zur Entwicklung; dagegen ist das Leptom mächtig ausgebildet. Auf Querschnitten zeigen die Bündel solcher Stellen folgendes Bild. Ihre Mitte wird von einem Kerne normaler Siebröhren und Geleitzellen eingenommen. Um diese herum haben sich in großer Menge leitende Elemente entwickelt, welche ihre Entstehung allen den Zellen verdanken, die normalerweise die übrigen Elemente des Bündels, vornehmlich das Hadrom und die Parenchymscheiden, bilden. Schon diese Neubildungen können als akzessorische Bündel bezeichnet werden, da ihre Elemente oft untereinander geschlossene Gruppen bilden, während sie mit den normal entwickelten Siebröhren in keiner Weise zu einem geschlossenen Ganzen verbunden sind. Zur

Bildung neuer Leitbündel kommt es aber vor allem in jenem äußeren Gewebe, das seine Entstehung aus dem einschichtigen Assimilationsgewebe ableitet. Diese Bündel liegen außerhalb der Sporenballen und verlaufen in der Längsrichtung des Blattes annähernd parallel zu den mittleren Hauptbündeln. Mit letzteren sowie untereinander sind sie durch zahlreiche Anastomosen verbunden. Die die mittleren mit den äußeren Bündeln verbindenden Anastomosen winden sich dabei durch die Sporenmassen des Pilzes. Letztere sind also schließlich allseits von leitendem Gewebe umgeben. Alle diese neu entstandenen Leitbündel zeigen den gleichen Bau und entstehen in folgender Weise. Die Zellen des sie bildenden Gewebes zerfallen durch Längsteilungen in eine größere Anzahl schmaler procambialer Zellen, welche durch reichlichen Gehalt an dichtem Plasma und große, meist ovale Kerne auffallen (Taf. II Fig. 16). Diese Zellen schließen zu einem kontinuierlichen Gewebe aneinander, nehmen dabei aber einen unregelmäßig geschlängelten Verlauf, der im wesentlichen durch die Lagerung der Sporen bedingt wird. Das so entstandene Gewebe kann als Procambium bezeichnet werden. Während nun ein Teil der Zellen desselben, und zwar meist die peripheren, zeitlebens in dem beschriebenen Zustande verharren, vergrößern sich andere bald in ihrem Quer- und Längsdurchmesser und werden dickwandig. Ihre Membran ist gekerbt oder einfach getüpfelt (Taf. II Fig. 17), sie sind kernlos und enthalten einen substanzarmen Plasmaschlauch, der in den Präparaten im Innern der Zelle zu einem dünnen Strange zusammengezogen war, während er sich an den Querwänden verbreiterte. Diese Querwände fallen sofort durch ihr stärkeres Lichtbrechungsvermögen und ihre meist uhrglasförmige Gestalt auf. Bei starker Vergrößerung gelingt es nachzuweisen, daß sie von zahlreichen Poren durchsetzt werden, also Siebplatten sind. Die beschriebenen Elemente haben mithin alle Eigenschaften von Siebröhren, wenn sie auch von den normalen durch ihre geringen Dimensionen und ihren häufig gewundenen Verlauf sich unterscheiden. Inwieweit die sie begleitenden Zellen als Geleitzellen zu bezeichnen sind, will ich dahin gestellt lassen; sie haben mit letzteren die Eigenschaft gemein, daß sie mit den Siebröhren durch korrespondierende Tüpfel verbunden sind (Taf. II Fig. 17). Andere als die beschriebenen Elemente kommen in den akzessorischen Bündeln nicht vor, diese enthalten also niemals irgendwelche Bestandteile des Hadroms. Auch in jenen Fällen, wo akzessorische Bündel im Gewebe der Blattinnenseite (also der Hadromseite) auftreten, wozu es kommt,

wenn hier gleichfalls Sporen gebildet werden, bestehen die Bündel ausschließlich aus den genannten Zellen. Betrachtet man Querschnitte durch Stellen, an welchen die Sporenballen ihre endgültige Größe erreicht haben, so sieht man, daß die letzteren das stärkeführende Parenchym ganz entleert und schließlich verdrängt haben. Es sind jetzt nur mehr die akzessorischen Bündel vorhanden, welche als dichtes Netz alle Zwischenräume zwischen den Sporen ausfüllen.

Der Pilz hat also seine Wirtpflanze zur Ausbildung eines Gewebes veranlaßt, welches nur für ihn von Vorteil ist. Während früher die weiten Gefäße im Dienste der Pflanze für Wasserzufuhr sorgten und dem Wassergewebe des Blattes die nötige Flüssigkeitsmenge zuleiteten, verlangt nunmehr der Pilz zur Sporenbildung eine große Menge von Baustoffen, zu deren Herbeischaffung die Bildung von Leptomelementen nötig wird. Die weitgehenden korrelativen Veränderungen der Gewebe der Wirtpflanze finden also ihre einfache Erklärung durch den vom Parasiten verursachten Funktionswechsel.

Anders wie in den Gallen selbst verhalten sich die Gefäßbündel an den Grenzen derselben. Die Zahl der Bestandteile hat gleichfalls zugenommen, doch ist hier auch das Hadrom stark entwickelt. Normalen Bau zeigt in diesem nur das Protohadrom, welches aus verholzten Ringgefäßen besteht. Später kommen Tracheen überhaupt nicht mehr zur Entwicklung. Die Zellen sind unverholzt und vereinen sich meist nicht zu Fusionen, sondern behalten den Charakter von Tracheiden. Diese schließen eine krumme Linie bildend aneinander (Taf. II Fig. 18), finden sich aber auch isoliert, sind dann häufig besonders weitlumig und Speichertracheiden ähnlich. Diese Verhältnisse finden sich vor allem in den zu beiden Seiten der Gallen im Blatte verlaufenden Gefäßbündeln. Es ist nicht anzunehmen, daß die hier stattfindende Vermehrung der Hadrombestandteile dem Pilze dient; dieser dürfte die nötigen Wassermengen durch jene Gefäße erhalten, welche beim Eintritt in das Gallengewebe ihr Ende finden. Ich glaube vielmehr, daß es sich darum handelt, dem oberen Teile des Blattes Wasser zuzuführen. Denn überall dort, wo Gallen auftreten, wird die Wasserleitung durch diese unterbrochen; es wird daher nötig sein, daß an den Seiten der Gallen eine erhöhte Wasserzufuhr stattfindet.

Die Veränderungen in der inneren und äußeren Epidermis hängen, wie erwähnt, von der Ausbildung der darunterliegenden Gewebe ab. Die normale Epidermis der Innenseite des Hüllblattes besteht aus großen, in regelmäßigen Reihen angeordneten Zellen,

welche eine eigentümliche, schädelnahtartige Verzahnung aufweisen (Taf. III Fig. 1). In den Reihen finden sich, gleichfalls regelmäßig verteilt, lange einzellige Haare und Spaltöffnungen. Letztere sind in zweierlei Weise ausgebildet. Die große Mehrzahl derselben zeigt den gewöhnlichen Gramineentypus. Zwischen ihnen aber treten andere auf, welche in ihrem Bau mit den von Haberlandt (I) an Gramineenkeimlingen (auch an Zea Mays) beobachteten Wasserspalten übereinstimmen (Taf. III Fig. I). Es fehlt ihnen jede Wandverdickung, und an Stelle einer Zentralspalte schließen die meist ungleich großen Schließzellen ein fast kreisrundes Loch ein. Der Beweis für die wasserausscheidende Funktion dieser Öffnungen müßte an lebendem Material erbracht werden. Untersucht man nun die innere Epidermis an den Stellen starker Gallbildung, so findet man ein kleinzelliges Gewebe von meristematischem Charakter. Jede Regelmäßigkeit in der Anordnung der Elemente ist geschwunden, die Zellen grenzen mit geraden Wänden aneinander, die normal auftretende Cutinisierung der äußeren Membranschichten ist nicht mehr vorhanden. Trichome fehlen gänzlich, die wenigsten Spaltöffnungen sind zur Ausbildung gekommen, sie sind auf verschiedenen Entwicklungsstufen stehen geblieben. Meist sind die Schließzellen bereits angelegt, ohne daß eine Zentralspalte vorhanden ist, oder es findet sich an Stelle letzterer ein cutinisierter Pfropfen, der sie verschließt (Taf. IV Fig. 1). Ob diese Spaltöffnungen überhaupt je zur Ausübung ihrer Funktion gelangen oder in ihrem Zustande verharren, ist schwer zu entscheiden. Gegen die erste Ansicht spricht, daß die Gallen ja überhaupt in kürzester Zeit aufbrechen und dann rasch zugrunde gehen. — Die Verhältnisse ändern sich, wenn man in der Beobachtung gegen die Grenzen der Gallen fortschreitet. Die Epidermiszellen sind hier größer und dickwandiger, es sind bereits einzelne Trichome vorhanden, und die Spaltöffnungen sind weiter entwickelt. Auffälligerweise fehlt ihnen aber in der großen Mehrzahl der Fälle die Verdickung der Wände (Taf. IV Fig. 2). Sie nähern sich in ihrem Aussehen mehr oder weniger den »Wasserspalten« des normalen Blattes. Auch bei ihnen ist an Stelle einer Zentralspalte eine ovale bis kreisrunde Öffnung vorhanden, ihre Schließzellen zeigen ein gesundes Aussehen, enthalten unveränderte Kerne und etwas Stärke. Normale Spaltöffnungen treten sehr selten auf, dagegen fand ich an einzelnen Stellen merkwürdige Mißbildungen. So beobachtete ich eine Spaltöffnung, deren eine Schließzelle den Gramineentypus (mit Wandverdickung) zeigte, während die andere unverdickt war (Taf. III

Fig. 2). Ferner fand ich Spaltöffnungen mit 4 Schließzellen, d. h. es waren an ihnen 4 Zellen vorhanden, welche alle die nierenförmige Gestalt von Schließzellen zeigten (Taf. III Fig. 3 u. 4); die inneren schlossen eine Zentralspalte ein. Alle 4 Zellen ließen die Kerne erkennen und enthielten in ziemlich gleicher Menge Chlorophyllkörner mit Stärkeeinschlüssen. In den beiden derartigen Fällen, die ich beobachtete, war die Ausbildung von Nebenzellen unterblieben. An ihrer Stelle waren also die »akzessorischen« Schließzellen zur Entwicklung gekommen. Inwieweit der ganze Apparat funktionstüchtig war, läßt sich natürlich nicht entscheiden, doch muß bemerkt werden, daß die normalen Nebenzellen keine Stärke besitzen, so daß die an ihrer Stelle vorhandenen Elemente jedenfalls einer andern, oder auch gar keiner Funktion dienten. — Die Epidermis der den Gallen benachbarten Stellen geht allmählich in die normale über. Die Zellen sind hier wieder groß und in Reihen angeordnet, doch fehlt ihnen zunächst noch die Verzahnung (Taf. II Fig. 8). In ihnen kommen die früher beschriebenen auffälligen Kernveränderungen zustande und findet die stärkste Zellulosebildung statt. Die Spaltöffnungen sind wieder regelmäßig angeordnet, doch fehlt ihnen meist noch die Wandverdickung.

Die Veränderungen der äußeren Epidermis sind ähnlicher Natur. Am normalen Blatte besitzt diese einen ungemein regelmäßigen Bau. Ihre Zellen sind langgestreckt, wellig verzahnt; zwischen ihnen treten zahlreiche Zwergzellen und in großer Menge Spaltöffnungen auf, welche ausnahmslos den Gramineentypus zeigen (Taf. III Fig. 5). Am Querschnitte (Taf. III Fig. 6) sieht man, daß die Zellwände sehr stark verdickt und geschichtet sind; ferner, daß sie alle — auch die Außenwände — von Tüpfeln durchzogen werden. Behandelt man die Schnitte mit Phloroglucin-Salzsäure, so geben die Epidermiszellen in ihrer unteren, d. i. inneren Hälfte deutliche Holzreaktion. Wie erwähnt, kommen die Gallen vor allem an der Außenseite der Blätter zur Entwicklung. Die sie überziehende Epidermis weicht wesentlich von der normalen ab und zeigt große Ähnlichkeit mit der beschriebenen jugendlichen Epidermis der Blattoberseite. Jede Regelmäßigkeit der Anordnung der Zellen, jede Verdickung, Verholzung und Verzahnung ihrer Wände ist verschwunden, die Tüpfel fehlen, und die Spaltöffnungen sind noch nicht entwickelt (Taf. III Fig. 7). An weniger stark veränderten Teilen kommen dann auch hier Spaltöffnungen ohne Wandverdickung mit großen Öffnungen zustande (Taf. III Fig. 8). Nur eine abweichende Erscheinung ist zu beobachten: wo nämlich

infolge der Sporenbildung tangentiale Spannungen in der Epidermis zustande kommen, welchen die Pflanze durch Zellwachstum nicht nachkommen kann, sei es, daß die Zellen überhaupt nicht mehr wachstumsfähig sind, oder so rasch sich nicht vergrößern können, da trennen sich die Schließzellen der Spaltöffnungen in der Richtung der Zentralspalte (Taf. IV Fig. 3 u. 4). Die Schließzellen gehen nun bald zugrunde und werden über die Epidermis emporgehoben (Taf. II Fig. 19), während sie normal etwas eingesenkt waren. Die Pflanze versucht jetzt, ein weiteres Einreißen dadurch zu verhindern, daß die an die Rißstellen angrenzenden Membranen zu dicken Polstern anschwellen, welche die Risse schließen (Taf. IV Fig. 4). Aber auch diese Polster werden durchbrochen, und nun geht der Riß durch die Epidermis weiter, und zwar nur dann nach den Zellgrenzen, wenn diese in der Verlängerung der Zentralspalte liegen (Taf. III Fig. 9). An derartig auseinandergetriebenen Spaltöffnungen wird dieselbe Substanz, mit der die Risse geschlossen werden, auch in den Atemhöhlen ausgebildet, so daß es zu einer teilweisen, vielleicht auch gänzlichen Verstopfung derselben kommt (Taf. III Fig. 10). Es scheidet dabei die Membran tropfenförmige Massen aus, oder sie geht gänzlich in der Bildung derselben auf. Sie färben sich mit Chlorzinkjod gelbbraun, besitzen aber nicht das starke Lichtbrechungsvermögen cutinisierter Membranen. Phloroglucin-Salzsäure färbt sie zum Teil ziegelrot, Methylgrün-Essigsäure — wie die verholzten Teile der Gefäßbündel — sofort blaugrün. Diese Reaktionen sprechen dafür, daß es sich um eine gummöse Veränderung der Membranen handelt, um »Wundgummi«, wie er auch in Callusbildungen beobachtet wurde. (Siehe Küster, S. 165.) Außer in den Spaltöffnungen fand ich ihn in der infizierten Infloreszenzachse überall dort in großer Menge, wo Interzellularen auftreten, welche normalerweise fehlen.

Unter dem Einfluß des Pilzes wird also die beiderseitige Epidermis aller der Eigenschaften beraubt, welche sie als mechanisch wirksames Schutzgewebe charakterisieren, und zwar deshalb, weil ein solches für den Pilz nicht nur überflüssig, sondern geradezu schädlich wäre. Es ist zu bedenken, daß für den Pilz alle Zellschichten, welche ihn von der Außenwelt trennen, als schützendes Gewebe in Betracht kommen, da er in der Regel nicht bis unter die Epidermis vordringt. Eine widerstandsfähige Ausbildung der letzteren würde aber das Sprengen der Gallen erschweren und so bei der Sporenzerstäubung hinderlich sein. — Was die neugebildeten Spaltöffnungen betrifft, so dürften diese kaum als Wasserspalten zu deuten sein.

Ich glaube vielmehr, daß ihre »Schließzellen« zwar nicht dem Verschluß, wohl aber der Aussteifung der Luftwege dienen, eine Erklärung, die Küstenmacher für ähnliche, auf Zoocecidien auftretende Gebilde gibt. Fungieren die Öffnungen aber in der Tat als Pneumathoden, so dürfte es korrekter sein, sie als Atemöffnungen zu bezeichnen, da von einer Spalte hier nicht mehr gut gesprochen werden kann.

Die Untersuchung des Kolbens brachte nichts wesentlich Neues. Er ist aus denselben Geweben zusammengesetzt, welche sich an den Orten starker Gallbildung in den Hüllblättern finden. Augenscheinlich war er vollkommen unter dem Einfluß des Pilzes entstanden und enthielt daher nur für diesen zweckmäßige Gewebe. Es sind dies ein ungemein zartwandiges, stärkereiches Parenchym und zahllose Leitbündel, welche ausschließlich aus den für die akzessorischen Bündel beschriebenen Elementen bestehen. Von einem Hadrom ist nichts zu sehen, die Wasserversorgung der Galle kann also nur auf osmotischem Wege von Zelle zu Zelle erfolgen. Zwischen den Geweben befanden sich überall die kugeligen Sporenklumpen des Pilzes. Das ganze Gebilde ist von einer zarten, großzelligen Epidermis umgeben, in welcher ziemlich zahlreich Spaltöffnungen auftreten. Diese besitzen ungewöhnliche Größe und weite, kreisrunde Öffnungen (Taf. IV Fig. 5). Bezüglich ihrer Funktion gilt das früher Gesagte.

Zusammenfassung.

1. Das vegetative Mycel des Pilzes gliedert sich nach Bau und Funktion in intra- und interzelluläre Verbreitungshyphen und Haustorien.

2. Das gesamte intrazelluläre Mycel bewirkt nur eine Einstülpung der Protoplasten, nicht aber eine Durchbohrung derselben.

3. Die Verbreitungshyphen sind zum größten Teil von Zellulosescheiden umgeben. Diese entstehen aus dem Plasma der Wirtzelle, wobei der Zellkern der letzteren an die Infektionsstelle wandert und auch durch sein weiteres Verhalten eine auffallende Beteiligung an der Zellulosebildung zeigt.

4. Die Zellkerne erleiden an den Gallgrenzen weitgehende Veränderungen, welche vor allem auf eine Oberflächenvergrößerung hinauslaufen, die nach erfüllter Funktion wieder zurückgeht. Die Kerne haben ihre Färbbarkeit eingebüßt.

5. Die Zellulosebildung ist eine Schutzmaßregel der Wirtzelle gegen den Parasiten.

6. Die Haustorien sind in der Regel nicht umscheidet. Mit dem Zellkerne sind sie häufig durch Plasmastränge verbunden.

7. Die Gallen entstehen erst bei der Sporenbildung des Pilzes.

8. Der durch den Pilz herbeigeführte Funktionswechsel führt zur Ausbildung neuartiger, ausschließlich dem Pilze dienender Gewebe. Während das normale Hüllblatt hauptsächlich auf Wasserspeicherung und Wasserleitung eingerichtet ist, wahrscheinlich, um den eingeschlossenen Kolben vor zu starker Transpiration zu bewahren, dient das Gallengewebe zur Speicherung und Leitung von Baustoffen für die Sporenbildung des Pilzes.

9. Als Speicher- bzw. Nährgewebe fungiert ein stärkereiches Parenchym, welches die Hauptmasse der Gallen ausmacht.

10. Zur Stoffleitung dient ein ausgedehntes System von Leptombündeln, welche aus procambialen und siebröhrenartigen Elementen bestehen. Das Hadrom wird in den Gallen gänzlich unterdrückt, ist aber an den Gallgrenzen stark entwickelt, wo es zum größten Teil aus unverholzten Tracheiden besteht.

11. Die Epidermen, welche normal in verschiedener Weise für mechanische Festigkeit ausgebildet sind, haben alle diesbezüglichen Einrichtungen verloren; diese würden bei der Sporenverbreitung des Pilzes hinderlich sein.

12. Das Durchlüftungssystem ist durch das Auftreten neuartiger Atemöffnungen ausgezeichnet, deren Zellen nur der Aussteifung, nicht aber dem Verschluß der Luftwege dienen können.

Puccinia Adoxae

auf

Adoxa Moschatellina.

Das Mycel dieser antöcischen Uredinee lebt interzellulär in den Geweben von Adoxa Moschatellina. Untersucht wurde Alkoholmaterial, das an Stielen, Blättern und Blüten von zahlreichen Teleutosporenlagern bedeckt war. Die infizierten Pflanzen zeigen gegenüber den normalen keine bedeutenden Veränderungen. Meine an diesem Objekt angestellten Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf Fragen der Zellpathologie, die durch das Verhalten der zahlreichen Haustorien, welche das Mycelium ins Innere der Zellen der Wirtpflanze entsendet, hervorgerufen werden. Diese

Haustorien zeigen an und für sich einen ungewöhnlichen Bau und fallen durch zwei Eigenschaften besonders auf. Erstens sind sie in ihrem basalen Teile von einer Zellulosehülle umgeben, und zweitens suchen sie regelmäßig den Kern der Wirtzelle auf und beeinflussen ihn in bestimmter Weise.

Was die Zellulosebildung betrifft, so geht sie hier in ähnlicher Weise vor sich wie bei Zea Mays, doch fehlt die auffällige Beteiligung des Kernes. Das Mycelium entwickelt an bestimmten, oft gegenüberliegenden Stellen feine seitliche Auszweigungen, die in die Membranen der Wirtzellen sich einzubohren beginnen. Auf diesen Reiz hin bildet die Zelle in ihrem Innern einen oft ziemlich mächtigen Zelluloseknopf aus, in welchen das Haustorium hineinwächst. Dabei behält letzteres entweder seine gerade Richtung bei, oder es krümmt sich in der Hülle (Taf. IV Fig. 6). Das Haustorium vergrößert nun seinen Durchmesser, und es gelingt ihm mit der Zeit, das Zellulosepolster an einer Stelle zu lösen. Es wächst hierauf weiter gegen das Zellinnere zu, wird dabei aber immer noch mit neugebildeter Zellulose umgeben. Die derart entstandene Scheide verliert jedoch bald an Mächtigkeit und hört schließlich ganz auf, so daß das Haustorium mit dem Plasma in Berührung tritt. Aber auch hier kommt es nur zu einer Einstülpung des Protoplasten, es ist stets möglich, die das Haustorium in seiner ganzen Ausdehnung umgebenden Mikrosomen zu beobachten. Ferner liegen demselben hin und wieder Chloro- oder Leukoplaste an (Taf. IV Fig. 7), was schon Laibgeb als Beweis für die Einstülpung des Protoplasten bei Pilzinfektion anführt. Die Scheiden lassen sich auch hier am deutlichsten nach Behandlung mit Chlorzinkjod erkennen, welches sie violettblau färbt. Von der übrigen Membran unterscheiden sie sich aber dadurch, daß sie sich mit Fuchsin intensiv dunkelrot tingieren und diesen Farbstoff ziemlich lange festhalten. Die die Haustorien mit dem interzellulären Mycel verbindenden feinen Kanäle werden ersichtlich, wenn man die Schnitte kurze Zeit in Salzsäure bringt und dann in Methylenblau überträgt. In diesem färbt sich das Plasma des Pilzes schön blau, und man kann nun den ganzen Hyphenverlauf und den Anschluß der Haustorien überall leicht erkennen. Die Umscheidung konnte ich sowohl im Blatte als im Stengel feststellen, nur im Leptom und im Holzparenchym fehlt sie; dagegen ist sie in den Gefäßen vorhanden, ein Beweis, daß hier die Haustorien schon sehr frühzeitig eingedrungen sind. Hat das Haustorium die Scheide verlassen, so wächst es noch eine Zeitlang als

einfache Hyphe fort, bis es sich plötzlich in ein ganzes Büschel von Hyphen verzweigt. Diese sind im Gegensatze zum Stiele des Haustoriums sehr plasmareich, vielfach gekrümmt und selbst wieder gegabelt (Taf. IV Fig. 7). Querwände konnte ich in den Haustorien niemals auffinden.

Schon bevor das Haustorium die Zellulosescheide verläßt, im allgemeinen von dem Moment an, wo es ihm gelingt, die anfängliche Membrananschwellung zu durchdringen, wächst es gerade auf den Kern der Wirtzelle los. Diese Erscheinung ist eine ganz allgemeine. Wo immer die Hyphe eingedrungen ist, stets sucht sie auf dem kürzesten Wege den Kern zu erreichen. Interessant ist das Verhalten derjenigen Haustorien, welche gerade an der Stelle in die Zelle eindringen, an welcher der Kern liegt. Um an diesem nicht vorbeizuwachsen, krümmen sie sich samt der Scheide so lange, bis die letztere durchbrochen ist. In diesem Falle zeigt es sich am deutlichsten, daß die Richtung der Scheidenbildung vom Pilze bestimmt wird. Dieses Wachsen von Haustorien gegen den Kern der Wirtzelle hat bekanntlich zuerst Rosen (II) an Puccinia asarina gefunden. Seither sind seine Beobachtungen von verschiedenen Autoren, so von Molliard (I), Sappin-Truffy, Vuillemin, Harper und Dangeard [1]) bestätigt und die Erscheinung für weitere Uredineen festgestellt worden [2]). Němec beobachtete ähnliches an der Mycorrhiza von Calypogeia, Groom an der von Thismia Aseroe. Letzterer bespricht in seiner Arbeit ausführlich die verschiedenen Möglichkeiten, welche zur Erklärung dieses Verhaltens herangezogen werden können. Einerseits müsse man daran denken, daß die Plasmaströmungen in der Zelle am stärksten gegen den Kern zu fließen, so daß die Hyphe wie ein in fließendes Wasser getauchter Zweig mitgerissen werde. Eine andere mögliche Erklärung sei, daß die Hyphe infolge ihres Chemotropismus den Kern aufsuche, indem die chemotropisch reizende Substanz in größter Menge in unmittelbarer Nähe des Kernes der infizierten Zelle gebildet werde oder angehäuft sei. Auf Grund mehrerer Beobachtungen entscheidet sich Groom für diese zweite Annahme, um so mehr, als Chemotropismus für Pilze schon in andern Fällen nachgewiesen wurde (Miyoshi). Den umgekehrten

1) Nach einer Angabe von Magnus a. a. O. S. 211.

2) Neuerdings von J. Erikson und G. Tischler für Puccinia Glumarum in »Das vegetative Leben der Rostpilze.« I. Kungl. Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. Bd. 37. Nr. 6. Stockholm 1904.

Gedanken, daß das Haustorium vom Kerne angezogen würde »in virtue of a repellent action of a substance which is consumed most rapidly near the nucleus«, weist der Verfasser zurück, da sie eine Reihe von Annahmen verlange, für die keinerlei Beweis vorliege. Groom nimmt also an, daß die chemotropisch wirksamen Stoffe in der Nähe des Kernes vorhanden seien, und zwar deshalb, weil dieser das Zentrum gewisser Stoffbildungsvorgänge (»the centre of certain metabolic changes«) sei, was aus seiner Beteiligung an Stärke- und Zellulosebildung hervorgehe. Gegen diese Ausführungen wendet sich Magnus, der in seiner Arbeit über Neottia sich gleichfalls mit der in Rede stehenden Erscheinung befaßt, obwohl er sie bei seinem Objekt niemals beobachten konnte. Er untersuchte einige Uredineenhaustorien und schreibt darüber (S. 213): »Dafür, daß sich das Haustorium den Zellkern selbst nutzbar macht, und ihm nicht wie einer Amme die Nährstoffe, die für die Zelle bestimmt waren, entzieht, spricht, daß schließlich ausnahmslos der befallene Kern degeneriert«. Schon vorher (S. 212) findet sich die Bemerkung: »Aus vielen Beobachtungen ist es mir unzweifelhaft, daß die Haustorien völlig entsprechend wie auf den Zellkern auch auf jeden andern zufällig in der Zelle befindlichen Körper, wie z. B. auf Stärkekörner, zuwachsen. So soll vielleicht nur die Aufnahme der festen Bestandteile der Zelle überhaupt erreicht werden. Denn ohne solche Haustorien bliebe der Pilz jedenfalls auf solche Nährstoffe angewiesen, die er auf osmotischem Wege dem Zelleibe zu entziehen vermag«. »In den krampfadrigen Verzweigungen und Buckelungen (der Haustorien)«, fährt er fort, »die häufig, wenn auch keineswegs nur in der Nähe des Kernes auftreten, vermag ich keine zur Nahrungsaufnahme besonders geeigneten Organe zu erkennen, da besonders bei den Buckelungen die minimale Oberflächenvergrößerung hiefür kaum in Betracht kommen kann. Hingegen scheint ein so unförmliches Gebilde (bei Puccinia Xanthii) eine ungeheure Materialverschwendung zu erfordern, deren Nutzen für den Pilz in keiner Weise zu ersehen ist. — Die auffallende Ähnlichkeit dieser Bildungen mit den Sporangiolen der Mycorrhizen läßt die Bedeutung der Erscheinung in einer ganz andern Richtung suchen. Jene Sporangiolen, die in so vielen endotrophen Mycorrhizen, jedoch nie in Orchideen, auftreten, stellen nach Janses Auffassung, die ich mir durchaus zu eigen mache, Degenerationsprodukte des Pilzes dar, die von der Pflanzenzelle erzogen werden, um von ihr später aufgelöst und zu ihrer Ernährung verwendet zu werden. So ist wohl der Nutzen dieser Gebilde

parasitischer Pilze auch nicht auf seiten des Pilzes, sondern auf seiten der Wirtpflanze zu suchen. Der chemische Reiz, durch welchen die Pflanze bzw. der Zellkern den Pilz veranlaßt, in dieser Form zu degenerieren, wäre danach eine wichtige Waffe im Kampfe der Zelle gegen den Parasiten. Sie verteidigt sich, indem sie dem Gegner die Kraft raubt, ihn unschädlich macht, ohne ihn zu töten.«

Um über die Berechtigung dieser verschiedenen Annahmen ein Urteil fällen zu können, wollen wir zunächst zur näheren Betrachtung unseres Objektes zurückkehren. Wie schon erwähnt, verzweigen sich die Haustorien, bald nachdem sie die Scheide verlassen haben, zu einem Büschel von Hyphen. In der Mehrzahl der Fälle haben sie dann den Kern der Wirtzelle schon erreicht und umschließen ihn nun krallenartig (Taf. IV Fig. 7 und 8 *d*). Die Kerne der infizierten Gewebe weichen, schon bevor sie die Haustorien erreicht haben, von denen der normalen erheblich ab. Meine Beobachtungen hierüber beziehen sich vor allem auf Tangentialschnitte durch die Rinde des Stengels. Diese besteht aus einem ungewöhnlich großzelligen, stärkereichen Parenchym. Die normalen Kerne, welche nach längerem Verweilen in Boraxkarmin (12—24 Stunden) sich sehr schön färben, sind breit spindelförmig, an einem oder beiden Enden in eine Spitze ausgezogen (Taf. IV Fig. 9). Das Chromatin ist in ihnen sehr regelmäßig verteilt, der meist in der Einzahl vorhandene Nucleolus ist klein, enthält oft eine kleine Vakuole und ist von einem schmalen Hof umgeben. Die Kerne des infizierten Gewebes sind im allgemeinen von runder Gestalt, sie nehmen bald an Größe zu, und es kommt dabei nicht selten zu einer unregelmäßigen Lappung, die aber nie zu derartigen Formen führt, wie ich sie an Zea Mays beobachtete, und die scheint's nie mit Amitose endet (Taf. IV Fig. 10). In der Verteilung der chromatischen Substanz ist eine Veränderung zu konstatieren. Es sind nämlich jetzt einzelne größere Kügelchen vorhanden, die den erwähnten Farbstoff sehr intensiv speichern (Taf. IV Fig. 8 u. 10). Sie finden sich in verschiedener Zahl meist an der Peripherie des Kernes und haben oft große Ähnlichkeit mit den in den Zellkernen der abgehobenen Epidermis von Capsella vorhandenen Chromatinkugeln. Von den Nucleolen sind sie stets durch das Fehlen eines Hofes und von Vakuolen leicht zu unterscheiden. Ich glaube, daß es sich hier wie bei Capsella um Gebilde handelt, die den von Peters, Rosen (I) und Zacharias beschriebenen »Pseudonucleolen« nahestehen. Ob sie wie diese sich durch Cyanophilie besonders auszeichnen, wurde nicht

untersucht; mit dem von Magnus beschriebenen »Ballungsstadium« scheint die Struktur wenig Ähnlichkeit zu haben[1]). — Was die Nucleolen betrifft, so haben sie stets an Größe, häufig auch an Zahl zugenommen, und zwar scheinen sie sich durch einfache Teilung zu vermehren. Sie enthalten meist eine sehr große Vakuole, so daß sie im optischen Querschnitt als Ring erscheinen (Taf. IV Fig. 8. u. 10) und sind von großen Höfen umgeben. — An diese Kerne nun treten die Haustorien mit ihren Endverzweigungen heran, worauf sich die letzteren dem Kerne auf das engste anschmiegen, zwischen seine Lappen eindringen und deutlich neue Einbuchtungen hervorrufen (Taf. IV Fig. 8). Es macht den Eindruck, als ob sich der Kern vor dem Haustorium zurückzöge, um sich derart vor diesem zu schützen. Man sieht daher die Enden der Haustorien oft tief in den Kern eindringen, ohne daß dessen Membran zerstört würde. Ganz ähnliches hat bereits Rosen (II) an den Haustorien von Puccinia asarina gefunden. Unter dem Einflusse des Haustoriums verändert der Kern aber bald sein Aussehen. Er nimmt zunächst an Größe ab, seine Membran wird faltig, mit einem Worte er schrumpft ein und macht den Eindruck einer ausgesogenen Blase (Taf. IV Fig. 8f). Gleichzeitig tritt ein Chromatinverlust ein. Während, wie wir gesehen haben, der Kern vor dem Angriffe durch das Haustorium sich durch bedeutenden

---

1) Als das Manuskript dieser Arbeit bereits abgeschlossen war, erschien Rosenbergs Abhandlung »Über die Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich« in Flora, 93. Bd., Jhrg. 1904, Heft III. Der genannte Verfasser beschäftigt sich darin vorwiegend mit der Beschaffenheit des ruhenden Kernes von Capsella Bursa pastoris. Er konstatiert, daß in ihm, wie auch bei einer Reihe anderer Pflanzen, stark färbbare Körner vorkommen, welche den Pseudonucleolen Rosens entsprechen, aber nicht nur, wie dieser annimmt, mit ihrer Substanz die Hauptmasse der Kernfäden ausmachen, vielmehr jedes für sich selbst ein Chromosom darstellen, und zwar deshalb, weil ihre Zahl genau mit der Chromosomenzahl in den Mitosen dieser Pflanze übereinstimmt. Rosenberg beschränkte sich auf die Untersuchung von Samenknospen. Es ist nun ganz gut möglich, daß die von mir für die Kerne der Epidermiszellen der Infloreszenzachse von Capsella beschriebene Struktur (S. 10) dieselbe ist, die Rosenberg in den Samenknospen bzw. Samen derselben Pflanze fand. Im normalen Kern entziehen sich diese Chromatinkörner infolge ihrer außerordentlichen Kleinheit wahrscheinlich zum Teil der Beobachtung, und werden erst im Kerne der abgehobenen Epidermis, wo sie bedeutend größer sind (Taf. I Fig. 10 *b*), in ihrer Gesamtheit sichtbar. Da ich aber Zählungen derselben nicht vorgenommen habe, muß ich die Frage, ob es sich tatsächlich um Chromosomen handelt, unentschieden lassen; noch weniger wage ich ein Urteil über die Natur der Chromatinkörner bei Adoxa, welche von den für Capsella beschriebenen doch einigermaßen abweichen.

Chromatinreichtum und bestimmte Anordnung dieser Substanz auszeichnete, sind jetzt die peripheren Chromatinkugeln verschwunden. Der Kern färbt sich nun sehr unregelmäßig. Meist läßt sich an ihm eine substanzarme körnige Partie unterscheiden, die an bestimmten Stellen in eine dichtere, oft ganz homogene Masse übergeht. Während die erstere den Farbstoff (Boraxkarmin) fast gar nicht oder doch nur schwach aufnimmt, färbt sich die letztere sehr stark. Es läßt sich nun ganz deutlich beobachten, daß dort, wo die Haustorien den Kern allseits umschließen, die färbbare Substanz zentral im Kerne liegt (Taf. IV Fig. 8f), während in jenen Fällen, wo das Haustorium dem Kerne nur an einer Seite anliegt, sie peripher, und zwar auf der dem Haustorium gegenüberliegenden Seite, gelagert ist (Taf. IV Fig. 8i, k). — Diese Bilder sprechen klar für folgende Annahme. Die Haustorien suchen den Kern nicht auf, weil er das Zentrum der Stoffbildung ist (Groom), noch werden sie von diesem zur Bildung sporangiolenähnlicher Körper veranlaßt (Magnus), vielmehr wächst das Haustorium gegen den Kern zu, um ihm seine spezifischen Substanzen, vor allem Chromatin und Kernsaft, zu entziehen. Nur so läßt sich die Einschrumpfung und der Chromatinverlust ungezwungen erklären. Wahrscheinlich sind es auch die genannten Substanzen, welche das Haustorium chemotropisch reizen. Die anfänglich am Kern auftretende Größenzunahme, Lappung und Chromatinanhäufung steht wohl mit der erhöhten Inanspruchnahme des Kernes in Beziehung, welche darin ihre Ursache hat, daß der Zelle vom Parasiten fortwährend Substanzen entzogen werden (vor allem Stärke, wovon noch später zu sprechen ist), die wieder ersetzt werden müssen [1]). Erst bis die Haustorien die Kerne erreicht und umklammert haben, saugen sie auch diese aus. Die durch die Verzweigung hervorgerufene Oberflächenvergrößerung kommt den Haustorien dabei sehr zustatten. Sie ist bei unserm Objekt keineswegs gering, vielmehr im Verhältnis zur Kerngröße — und diese kommt natürlich allein in Betracht — eine ganz wesentliche. Von einer »ungeheuern Materialverschwendung« aber kann nicht die Rede sein; übrigens läßt sich auch an der von Magnus für Puccinia Xanthii gegebenen Abbildung eine solche nicht erkennen. In zweiter Linie macht es die Umklammerung des Kernes durch die Hyphen der Zelle unmöglich, denselben

1) Ferner ist daran zu denken, daß der Kern wohl auch hier an der Neubildung von Zellulose beteiligt ist, wenn er auch nicht an die Bildungsstelle wandert.

dem Einfluß des Haustoriums zu entziehen. Erwähnt muß noch werden, daß Magnus für Puccinia leucospermum auf Anemone nemorosa beobachtete, »daß die keulenförmigen Haustorien mit typisch zwei Zellkernen erst relativ spät, zu einer Zeit, wo schon die Spermogonien ausgebildet und die Aecidien bereits in der Anlage vorhanden sind, eindringen, — sich dann allerdings immer fest an den Kern anlegen und ihn so einbuchten —, so daß die Ernährung des Pilzes schon vorher osmotisch durch die interzellulären Hyphen erfolgt sein muß«. Ich glaube nicht, daß dieser Einwand die von mir vertretene Auffassung zu widerlegen vermag. Zunächst muß ich betonen, daß bei Puccinia Adoxae die Bildung der Haustorien jedenfalls sehr frühzeitig erfolgt. Sonst könnten unmöglich die in den wasserleitenden Gefäßen befindlichen von Scheiden umgeben sein. Es liegt freilich sehr nahe, anzunehmen, daß der Pilz die Kernstoffe bei der Sporenbildung benötigt; doch waren auch bei Puccinia leucospermum, wie Magnus selbst zugibt, die Aecidien erst in der Anlage vorhanden, ferner ist nicht ausgemacht, ob nicht außer diesen schon angelegten später noch weitere zur Entwicklung gekommen wären.

Mit einigen Worten sei schließlich noch der Einfluß des Pilzes auf die Stärkebildung besprochen. Wie erwähnt, finden sich in den inneren Schichten der Rinde des Stengels zahlreiche Stärkekörner. Diese sind meist einfach, von ovaler Gestalt, seltener zusammengesetzt und stets deutlich geschichtet (Taf. IV Fig. 11). In den Zellen aber, die von Haustorien angegriffen werden, ist sehr wenig Stärke vorhanden, und zwar in ganz anderer Form. Jeder Leukoplast enthält nunmehr mehrere kleine Körnchen, welche erst nach Behandlung mit Jodlösungen deutlich sichtbar werden (Taf. IV Fig. 7). Die Stärkebildung kann also vom Pilze beeinflußt werden, ohne daß er mit den Leukoplasten in Berührung tritt; denn daß die Haustorien ebenso wie auf den Zellkern auch auf die Stärkekörner zuwachsen, wie Magnus angibt, konnte ich an meinem Objekt niemals beobachten; ferner ist das Aussehen der peripher gelegenen Leukoplasten kein anderes als das der dem Kern anliegenden. Ich halte es nun nicht für sehr wahrscheinlich, daß die in den Leukoplasten erzeugte Stärke nachträglich vom Pilze durch Ausscheidung eines Enzyms wieder gelöst wird; vielmehr dürfte dieser die in die Zelle einwandernden löslichen Kohlehydrate osmotisch aufnehmen, bevor sie von den Leukoplasten in Form von Stärke gespeichert werden. Den letzteren fehlen infolgedessen die zu ihrer normalen Tätigkeit nötigen Stoffe, und sie bleiben daher inhaltsarm. Indessen

ist auch die Erklärung nicht ganz von der Hand zu weisen, daß die durch den Pilz hervorgerufene Degeneration des Zellkernes eine normale Stärkebildung unmöglich macht; hat doch gerade an Adoxa Moschatellina A. Meyer[1]) eine Erscheinung beobachtet, die einen Einfluß des Zellkernes auf die Stärkebildung vermuten läßt.

Zusammenfassung.

1. Die in die Wirtzellen entsendeten Haustorien des interzellulären Mycels sind an der Basis von Zellulosescheiden umgeben, die aus dem Plasma entstehen.

2. An ihrer Spitze sind die Haustorien frei und zu einem Büschel verzweigt, dabei aber kontinuierlich von Plasma umgeben.

3. Die Haustorien wachsen stets auf kürzestem Wege gegen den Kern zu und umschlingen ihn krallenartig oder legen sich ihm wenigstens eng an.

4. Der Zellkern zeigt, bevor ihn das Haustorium erreicht, eine Größenzunahme, manchmal auch Lappung und eine periphere Chromatinanhäufung, die an die Struktur der »Pseudonucleolen« erinnert.

5. Sobald das Haustorium den Kern erreicht hat, schnürt und buchtet es diesen ein. Der Kern schrumpft ein, da ihm Kernsaft und Chromatin vom Pilz entzogen werden.

6. Wir können also annehmen, daß das Haustorium, durch die Kernsubstanzen chemotropisch gereizt, den Kern aufsucht, um ihm die letzteren zu rauben.

7. In der infizierten Rinde bilden die Leukoplasten keine normale Stärke, sondern nur kleine Körnchen, da ihnen wahrscheinlich die zur Stärkebildung nötigen Stoffe vom Pilz entzogen werden.

Anhangsweise seien noch einige auf Uromyces Alchemillae auf Alchemilla vulgaris bezügliche Daten mitgeteilt. Im Rindenparenchym des Blattstieles sind die oft vielfach gewundenen Haustorien mit basalen Zellulosescheiden versehen (Taf. IV Fig. 12). Sie wachsen hier nicht auf den Kern zu, dieser zeigt keine auffallenden Veränderungen.

---

1) Siehe Haberlandt (I), S. 241: »In Geweben, in welchen Stärke aus anderen Assimilaten gebildet wird, besonders in jungen Pflanzenteilen und Speichergeweben, findet man oft die Chromatophoren rings um den Zellkern angehäuft; sie zerstreuen sich aber wieder, sobald die Stärkekörner in ihnen sehr groß geworden sind. Nach Auflösung dieser letzteren kann dann abermals Anhäufung um den Zellkern erfolgen (Orchis fusca, Adoxa moschatellina, nach A. Meyer).«

Es sind in diesem Gewebe aber nur vereinzelte Hyphen des Pilzes und daher auch sehr wenige Haustorien zu finden. In der Blattspreite dagegen, wo das Mycel üppig entwickelt ist und an deren Unterseite die Sporenbildung stattfindet, suchen die Haustorien die Zellkerne auf, umschlingen sie und buchten sie ein. Am schönsten ist diese Erscheinung in der unteren Epidermis zu beobachten, in der fast alle Zellen Haustorien enthalten. Zellulosescheiden dagegen kommen in der Spreite des Blattes nicht zur Ausbildung.

Exobasidium Rhododendri

auf

Rhododendron ferrugineum und Rh. hirsutum.

Genauere anatomische Untersuchungen über Exobasidiumgallen wurden bisher nur für Exobasidium Vaccinii auf Vaccinium Vitis idaea angestellt. Woronin und Wakker haben sich damit beschäftigt und übereinstimmend gefunden, daß die Veränderungen der Blätter im wesentlichen darin bestehen, daß eine Vermehrung der Elemente des Palisadengewebes und des Schwammparenchyms stattfindet, die Chlorophyllbildung aber gänzlich zurücktritt. Die Palisadenzellen enthalten rötlichen Zellsaft, das Schwammparenchym hat seine Interzellularen verloren und besteht aus großen rundlichen Zellen, welche einen schwachen plasmatischen Wandbeleg und reichlich Zellsaft enthalten. Eine Vermehrung der Gefäßbündel wurde nicht beobachtet, dagegen hatte die Zahl der Elemente in den die Gallen durchziehenden Bündeln zugenommen. — Geyler teilt über die anatomischen Verhältnisse der Gallen des Exobasidium Lauri so gut wie nichts mit, ausführlicher bespricht Molliard (V) die Veränderungen eines Symplocos durch Exobasidium Symploci (Ellis). Auf seine Ergebnisse werde ich noch später zu sprechen kommen. Über die Gallen der Alpenrosen fehlen meines Wissens bisher nähere Angaben. M. Fockeu hat nach einer Bemerkung Molliards die Gallen des Rhododendron dadoricum untersucht, welche durch den gleichen Pilz hervorgerufen werden. Leider war mir diese Arbeit nicht zugänglich, auch konnte ich keine Referate über sie auffinden.

Der Sommer des Jahres 1903 bot mir Gelegenheit, reichliches Material von Exobasidium Rhododendri auf Rhododendron ferrugineum und Rh. hirsutum zu sammeln. Ich will vorausschickend

bemerken, daß die Gallbildung vor allem an der erstgenannten Art untersucht wurde, doch zeigte der Vergleich mit der andern, daß die Gallen der beiden Wirtpflanzen in keinem wesentlichen Punkte voneinander abweichen.

Wir wollen uns zunächst kurz der Betrachtung der morphologischen Veränderungen zuwenden, welche in zwei ziemlich scharf getrennte Gruppen zerfallen. Entweder wird nur eine bestimmte Stelle des Blattes zur Gallbildung angeregt, oder es degeneriert ein ganzer Sproß. Im ersten Fall entsteht aus einer 4—5 qmm großen Stelle der Blattspreite, und zwar an deren Unterseite, ein großes, apfelförmiges Gebilde. Der übrige Teil des Blattes entwickelt sich normal, nur bleibt dieses oft zwerghaft klein. Seltener kommt es dazu, daß sich die Blattspitze in eine Galle verwandelt. Im zweiten Falle schwillt die Vegetationsspitze samt den jüngsten Blättern und Blattanlagen zu einem unförmigen Klumpen an, von welchem die älteren Blätter als dicke, fleischige Schuppen abstehen. Die anatomische Untersuchung zeigte, daß die verschiedenen Gallformen aus denselben Elementen sich zusammensetzen, deren Anordnung aber in den einzelnen Fällen eine verschiedene ist.

Das normale Blatt von Rhododendron ferrugineum besitzt folgenden Bau. An die Epidermis der Blattoberseite, welche aus polygonalen Zellen mit sehr dicker Außenwand und Cuticula besteht, schließen sich vier Reihen Palisadenzellen an, auf welche ein lockeres Schwammparenchym folgt, das gleichfalls lebhaft assimiliert. Die Epidermis der Blattunterseite besitzt papillös vorgestülpte Außenwände und wird von sehr zahlreichen Spaltöffnungen unterbrochen, die der Oberseite ganz fehlen. Die untere Epidermis ist überall von den bekannten Schildhaaren[1]) bedeckt. — Bei Betrachtung des infizierten, in Alkohol fixierten Materials lenkte zunächst folgende Erscheinung die Aufmerksamkeit auf sich. Die Gallen bestehen der Hauptsache nach aus großen, eng aneinanderschließenden, parenchymatischen Zellen. Sämtliche Radialwände derselben waren, besonders im peripheren Teile der Gallen, sehr regelmäßig wellig gebogen, genau so, wie das in typischen Wassergeweben, z. B. im Blatte von Peperomia, der Fall ist[2]) (Taf. IV Fig. 13). Die Wellung ist am auffälligsten in der 2. bis 5. subepidermalen Zellage, setzt sich aber noch

1) Siehe H. Solereder, Systematische Anatomie der Dicotyledonen. Stuttgart 1899. S. 547.

2) Siehe Haberlandt (I), S. 360.

durch viele Schichten fort und verliert sich schließlich gegen das Innere der Gallen zu. Läßt man die ganzen Gallen oder die Schnitte längere Zeit in Wasser quellen, so verschwindet die Wellung, die Radialwände strecken sich und werden gerade. Es ist hier also dasselbe »blasebalgähnliche Spiel« vorhanden, wie sonst in Wassergeweben. Es liegt kein Grund vor, daran zu zweifeln, daß ebenso wie an der toten auch an der lebenden Galle je nach dem vorhandenen Wasservorrat die Zellwände straff gespannt oder wellig eingebogen sein werden. Die Fähigkeit der Wellung der Wände wird durch ihre große Zartheit ermöglicht. Nach Anwendung von Chlorzinkjod sieht man, daß in ihnen überall große Tüpfel auftreten. Der Inhalt dieser Zellen besteht im wesentlichen aus Zellsaft, welcher von einem substanzarmen, dünnen Plasmaschlauch umschlossen wird, der einen kleinen linsenförmigen Kern enthält. Chlorophyll und Stärke fehlen gänzlich. — Dieses Gewebe, das also alle Charaktere eines Wassergewebes besitzt und, wie noch später näher auszuführen sein wird, jedenfalls auch als solches fungiert, findet sich in gleicher Ausbildung in allen Gallen. Nur die Ansatzstellen der apfelartigen Blattgallen sind insofern abweichend gebaut, als ihre Zellen noch die Palisadenform besitzen, ohne indessen Chlorophyll zu enthalten. An den ganz vergallten Blättern hingegen ist ein Unterschied zwischen Oberseite und Unterseite nicht mehr vorhanden.

In Übereinstimmung und im Zusammenhange mit diesem Wassergewebe steht die Ausbildung und Anordnung des Gefäßbündelsystems. Letztere ändert sich begreiflicherweise mit der Form der Galle. Schon mit freiem Auge, oder bei schwacher Vergrößerung, sieht man, wie zu den Galläpfeln der Blätter vom Medianus aus mehrere dicke Nerven verlaufen und in die Ansatzstelle münden (Taf. IV Fig. 14). Durchschneidet man die Galle derart median, daß man diese Bündel senkrecht trifft, so findet man, daß von ihnen aus gegen die Peripherie zu in großer Menge Gefäßbündel ziehen. Diese verzweigen sich wiederholt dichotom, so daß schließlich eine große Menge feiner Bündelendigungen gegen die Oberfläche der Galle ausstrahlt (Taf. IV Fig. 15). Führt man den Schnitt in beliebiger anderer Richtung, so findet man immer wieder dieselbe Erscheinung. Es gehen also von den Gefäßbündeln der Ansatzstelle radial nach allen Richtungen des Raumes Abzweigungen aus, ganz ähnlich, wie etwa in einem Apfel die Leitungsbahnen angeordnet sind. Betrachten wir dagegen Längsschnitte durch die ganz veränderten fleischigen Blätter infizierter Vegetationsspitzen, so finden wir, daß bei diesen der

Bündelverlauf ein ähnlicher ist, wie im normalen Blatt. Von einem zentralen Strang aus gehen die sekundären Bündelzüge gegen die Blattränder zu, wobei sie sich wiederholt gabeln und schließlich, knapp unter der Oberfläche, verlieren (Taf. IV Fig. 16 *a*). Ein wesentlicher Unterschied gegenüber dem Verlauf im normalen Blatte liegt zunächst in der viel reichlicheren Verzweigung, dann aber auch darin, daß diese nicht nur wie im gesunden Blatt in einer Ebene erfolgt, sondern daß infolge der Dicke der Neubildung vom Medianus aus nach allen Seiten Bündel verlaufen. Durchschneidet man also ein solches Blatt senkrecht zu seiner Fläche, so erhält man ein ähnliches Bild, wie wenn man parallel zu derselben geschnitten hat (Taf. IV Fig. 16 *b*).

Die anatomische Untersuchung des Gefäßbündelsystems ergab folgendes. Wir gehen von der Beschreibung der Leitungsbahnen aus, welche sich in der sonst normalen Pflanze finden und die Zuleitung der Stoffe zu den Gallen bewerkstelligen. Diese weichen, wie erwähnt, schon makroskopisch durch stärkere Entwicklung von den normalen ab; dementsprechend findet man bei mikroskopischer Untersuchung eine ganz außerordentliche Vermehrung der Elemente. Diese betrifft sowohl Leptom als auch Hadrom, ist aber bei letzterem noch viel auffallender. Führt man Längsschnitte durch die zu den Galläpfeln der Blätter führenden dicken Nerven, so sieht man, daß das Hadrom aus einer großen Zahl paralleler Reihen von Tracheiden besteht. Diese sind kurz und breit (Taf. IV Fig. 17), dabei fast alle von gleicher Länge, so daß ein ziemlich regelmäßiger Holzkörper gebildet wird. Die Phloroglucin-Salzsäurereaktion zeigt, daß sämtliche Tracheiden verholzt sind. Sie finden sich in gleicher Ausbildung im Medianus und im Blattstiele gallentragender Blätter, setzen sich aber auch in die Achse fort. Von den normalen Tracheen sind sie leicht zu unterscheiden; diese sind sehr schlank und besitzen feine Spiralverdickung. Zu bemerken ist, daß in den zu den Gallen führenden Bündeln oft neben den beschriebenen Tracheiden die normalen Tracheen gesondert verlaufen. Das Leptom ist an diesen Stellen gleichfalls stark entwickelt; ein Abweichen der Elemente von den normalen wurde nicht beobachtet. — Derartig gebaute Bündel treten in die Gallen ein und verzweigen sich hier in der früher beschriebenen Weise. Sie können nunmehr der großen Mehrzahl nach als akzessorisch bezeichnet werden (so vor allem sämtliche Bündel der apfelartigen Gallen), und zeigen einen von den Zuleitungsbündeln ganz abweichenden Bau. Sie bestehen alle aus Hadrom- und Leptom-

elementen, wobei die ersteren deutlich vorherrschen. Die wasserleitenden Elemente sind von den normalen nur wenig verschieden. Sie sind verholzt, besitzen Spiralverdickung und erreichen oft erhebliche Länge; doch bleiben ihre Querwände erhalten, so daß sie als Tracheiden zu bezeichnen sind. Im Leptom finden sich anscheinend normale Siebröhren. Diese beschriebenen Elemente werden von zahlreichen langgestreckten Parenchymzellen begleitet. — Von Wichtigkeit ist das Aussehen und Verhalten der letzten Auszweigungen des Bündelsystems an der Peripherie der Gallen. Ein eingehendes Studium derselben wird sehr erleichtert, wenn man die Schnitte 1—2 Tage lang mit Eau de Javelle behandelt. Man sieht dann, daß die Bündel bis knapp an die Oberfläche der Gallen vordringen und sich hier pinselförmig verzweigen. Ihre letzten Endigungen reichen bis unter die erste subepidermale Zellschicht (Taf. IV Fig. 18 u. 19). Bei Betrachtung der Oberfläche zeigt sich, daß sie dann noch eine Zeitlang parallel zu dieser verlaufen. Diese letzten Auszweigungen bestehen in der Regel aus einer langgestreckten Tracheide, an welche sich oft noch mehrere kürzere und breitere anschließen (Taf. IV Fig. 18). Sie werden von dem schon erwähnten Leitparenchym begleitet. Während nun in einigen Fällen die Tracheiden selbst bis zu der erwähnten Zellschicht führen (Taf. IV Fig. 19), enden sie in andern schon früher und werden nun von unverdickten schmalen Elementen fortgesetzt, die denen des Leitparenchyms vollkommen gleichen (Taf. IV Fig. 18). Ebensolche Zellen bilden aber auch die Fortsetzung der Siebröhren, welche — wenigstens in normaler Ausbildung — noch früher als die Tracheiden enden. Diese Zellen dienen also sowohl der Stoff- als auch der Wasserleitung und gehen schließlich in die Zellen der subepidermalen Schichten über. Bei Wasserentzug stellt sich an ihnen eine äußerst feine Wellung der Längswände ein. An Querschnitten (Taf. IV Fig. 20) sieht man, daß die auf gleicher Höhe befindlichen Elemente einer Bündelendigung einer einzigen Mutterzelle angehören.

Der ganze beschriebene Gefäßbündelverlauf findet seine Erklärung in der Verteilung des Pilzmycels in der Galle. Im ganzen großen Gallenkörper sind nur Spuren desselben zu finden. Sein Nachweis gelingt am leichtesten durch Chlorzinkjodbehandlung, welche zwar die Pilzmembranen zerstört, aber den Inhalt der Hyphen bräunt. Dagegen kann man das Mycel stets ohne weiters zwischen der 1. und 2. subepidermalen Zellschicht beobachten (Taf. IV Fig. 19), vor allem aber unter der Epidermis, wo es am stärksten entwickelt ist und

ein Pseudoparenchym bildet. Dieses erkennt man deutlich, wenn man die Schnitte mit Methylenblau färbt, das vom Plasma des Pilzes rasch gespeichert wird. Von diesem subepidermalen Mycel aus wachsen die Basidien zwischen den Radialwänden der Epidermiszellen nach auswärts, bis sie die Cuticula erreichen. Diese wird dann von jeder Basidie einzeln kreisförmig durchlocht, worauf die letzteren über sie hinauswachsen. Wenn die Basidienbildung fortschreitet, zeigen die Radialwände der Epidermiszellen in der Oberflächenansicht ein perlschnurartiges Aussehen, indem die Basidien dicht nebeneinander stehen, jedoch voneinander durch kurze, nicht auseinanderweichende Stellen der Zellwand getrennt sind (Taf. IV Fig. 21). Die Durchbohrungen der Cuticula gehen nun nach den Zellgrenzen ineinander über, so daß nur noch Schuppen der Cuticula der Epidermis aufsitzen. In älteren Gallen fand ich stets die Epidermiszellen ganz vom Pilzmycel umsponnen (Taf. IV Fig. 19). Es scheint also, daß dieses den Basidien nachdringt und sich dann unter der durchlochten Cuticula ausbreitet. Die Schuppen der letzteren bleiben nämlich erhalten und bedecken das Mycel (Taf. IV Fig. 18 u. 19). — Während also sonst in Mycocecidien das vegetative Pilzmycel die ganze Galle durchzieht und so imstande ist, die verschiedensten Partien der Wirtpflanze auszunützen, ist hier das Mycel fast ausschließlich in der Peripherie der Galle vorhanden. Daselbst entsendet es zahlreiche Haustorien in die Zellen der Wirtpflanze. Diese sind unverzweigt, knopf- oder zäpfchenförmig, oder auch gegabelt (Taf. IV Fig. 22). Natürlich kann der Inhalt dieser wenigen Zellen für die ganze Entwicklung des Pilzes nicht ausreichen, sondern muß stets erneut werden. Dafür sorgt nun das weitverzweigte Gefäßbündelsystem, das bis zu diesen Zellagen führt. Es ist aber auch nötig, daß diejenigen Zellen, in welchen die Aufnahme der Stoffe durch den Parasiten erfolgt, möglichst lange am Leben bleiben. Ihr Protoplast wird daher von den Haustorien nicht zerstört, sondern nur eingestülpt, ferner schützen sie sich dadurch, daß sie die Haustorien zum Teil in Zellulosescheiden einhüllen. Diese entstehen hier nicht als Fortsetzungen der Zellmembran, sondern wie bei Capsella erst an den fertigen Haustorien frei aus dem Plasma. Wenigstens konnte ich an einigen Stellen beobachten, daß nur die Spitze des Haustoriums eine Zellulosekappe trug, ferner ist die Hülle am Ende desselben stets am dicksten (Taf. IV Fig. 22*c*, *d*). Die Verbindung mit der Zellmembran dürfte also erst nachträglich erfolgen. Die Scheiden fallen besonders an Präparaten auf, die mit Eau de

Javelle behandelt wurden. Durch dieses werden nämlich die Pilzhyphen vollkommen zerstört, es verschwinden also auch die nicht umscheideten Haustorien, während die Scheiden erhalten bleiben und nun mit Chlorzinkjod Blaufärbung zeigen. — Wir haben gesehen, daß für die Ernährung des Pilzes durch Herantreten des Gefäßbündelsystems bis unmittelbar an sein Mycelium ausgezeichnet gesorgt ist. Ziehen wir nunmehr in Erwägung, was für Stoffe es sind, die der Pilz benötigt, so kommen wir zu folgenden Ergebnissen. Zunächst müssen ihm die für sein Wachstum und die Sporenbildung erforderlichen plastischen Baustoffe geliefert werden. Die Zahl der Sporen ist hier aber keine große, besonders wenn man sie mit den Sporenmassen vergleicht, die z. B. eine Ustilaginee in ihrer Wirtpflanze zur Entwicklung bringt. Ferner sind sowohl die Sporen als auch die Basidien und das gesamte Mycel sehr zartwandig und von geringen Dimensionen. Die Menge der zum Aufbau dieses Pilzkörpers notwendigen Stoffe kann also keine große sein, jedenfalls steht sie in keinem Verhältnis zur Größe der Galle. Diese wird aber auch nicht von einem Speichergewebe für feste Stoffe (einem Nährgewebe) gebildet, sondern besteht, wie wir gesehen haben, aus Wassergewebselementen. Daß der Pilz große Wassermengen braucht, ist sehr einleuchtend. Seine oberflächliche Lage in den Gallen muß als eine sehr exponierte bezeichnet werden, was wieder durch den Vergleich mit den tief im Innern ihrer Wirtpflanzen lebenden Ustilagineen besonders klar wird. Hier ist es aber nicht nur das Hymenium (wie z. B. bei Albugo und den Uredineen), das nach Zerreißen der Cuticula (bzw. der Epidermis) mit der freien Luft in Berührung tritt, sondern es ist auch das vegetative Mycel an der Oberfläche gelegen. Was den Vergleich mit Exoascus betrifft, so ist hervorzuheben, daß es sich bei letzterem um Endosporen handelt, und daß der diese einschließende Ascus viel widerstandsfähiger ist als das Mycelium des Exobasidium; so widersteht er z. B. der Behandlung mit Eau de Javelle und wird durch Chlorzinkjod zwar zum Quellen gebracht, aber nicht zerstört. — Die Durchlochung der Cuticula durch die Basidien hat für die Galle einen sehr bedeutenden Transpirationsverlust zur Folge, welcher nur dadurch etwas vermindert wird, daß die Cuticula nicht abgeworfen wird, sondern zwischen den Basidien erhalten bleibt. Dazu kommt noch, daß die Rhododendren auf ihren Standorten sehr häufigen und heftigen Winden, sowie starker Insolation ausgesetzt sind. Daß dem so ist, beweist am besten die Anlage des Durchlüftungssystems an diesen Pflanzen.

Wie erwähnt, treten Spaltöffnungen nur an der Blattunterseite auf und sind hier von einem ganzen Panzer von Schildhaaren bedeckt, welche übereinander greifen, so daß unter ihnen ein völlig abgeschlossener, windstiller Raum entsteht. Bedenkt man ferner, wie sehr z. B. bei einem Röhren- oder Blätterpilze die Basidien gegen zu starke Transpiration geschützt sind, indem sie an der Unterseite des Hutes auftreten und hier erst noch in den Röhren und zwischen den Lamellen verborgen sind, so wird es einem begreiflich, warum der Pilz in unserem Falle die Wirtpflanze zur Ausbildung so großer Gallen veranlaßt, welche nichts anderes darstellen als ein großes Wasserreservoir, das durch zahlreiche Zuleitungen immer aufs neue gespeist werden kann. Das schließt nicht aus, daß auch hier das Prinzip der Oberflächenvergrößerung mitwirkend ist. An dieser Stelle sei bemerkt, daß Molliard (V) im infizierten Blattstiele des Symplocos gleichfalls die Ausbildung eines Systems akzessorischer Bündel beobachtete, von denen er angibt, daß sie ganz regellos verlaufen, die aber, wie aus seiner Abbildung deutlich hervorgeht, auch hier gegen die Peripherie zustreben. — Vor Ausbildung der Basidien ist der Pilz gegen zu starke Transpiration dadurch geschützt, daß die Galle gar keine Spaltöffnungen besitzt. Sie ist vielmehr überall gleichmäßig von einer zarten Epidermis überzogen, deren Wände manchmal wellig ineinandergreifen. An ganz jungen Gallen sieht man bei Betrachtung der Oberfläche stellenweise noch die durch cuticulare Verdickungsleisten markierten Grenzen der ursprünglichen Epidermiszellen, welche jetzt selten eine geringe (Taf. IV Fig. 23), meist aber eine sehr große Zahl von Tochterzellen einschließen. Schildhaare kommen gleichfalls nicht zur Ausbildung. In diesem Alter der Gallen genügt zur Deckung des ziemlich gleichmäßigen Transpirationsverlustes jedenfalls die fortlaufende Wasserlieferung seitens der Gefäße. Im Moment der Durchbohrung der Cuticula aber reicht sie nicht mehr aus, um so weniger, als diese fast an allen Stellen gleichzeitig erfolgt. Aber gerade in diesem Zeitpunkte ist das Vorhandensein von Wasser am notwendigsten, um die zarten Basidien vor dem Vertrocknen zu bewahren. Jetzt tritt das Wassergewebe in Aktion; dieses allein ist imstande, die plötzlich eingetretene starke Wasserabgabe sofort wieder zu ersetzen und den Pilz auf diese Weise turgeszent zu erhalten.

Die Exobasidiumgallen der Alpenrosen stellen also in jeder Hinsicht hochorganisierte Gebilde dar. Sie sind nach der Terminologie Küsters zweifellos zu den Prosoplasmen zu rechnen, denn sie sind

»Neubildungen, bei welchen auch andere histologische Charaktere, als die von Hemmungs- und Callusbildungen her bekannten« auftreten; auch kommt ihnen, wenigstens den Galläpfeln der Blätter, die von Küster geforderte Konstanz der Form zu.

Zusammenfassung.

1. Die Gallen treten entweder als apfelartige Gebilde an sonst normalen Blättern auf, oder es sind ganze Sprosse in Gallen verwandelt.

2. Sie bestehen im wesentlichen aus einem typischen Wassergewebe, welches Wellung der radialen Zellwände und das bekannte blasebalgähnliche Spiel zeigt.

3. Die Gallen sind von einem System akzessorischer Gefäßbündel durchzogen, in welchen besonders die kurzen, verholzten Tracheiden auffallen. Ferner treten in ihnen Siebröhren und leitende Elemente ohne besondere anatomische Charakterisierung auf.

4. Die Anordnung der Bündel ist eine derartige, daß ihre letzten Endigungen überall gegen die Peripherie hin führen, sich daselbst pinselartig verzweigen und bis zur subepidermalen Zellschicht vordringen.

5. Das Mycelium des Pilzes findet sich fast ausschließlich unter der Epidermis und zwischen der ersten und zweiten subepidermalen Zellschicht. Es bildet Haustorien, welche den Protoplasten einstülpen und zum Teil von der Spitze her mit Zellulose umscheidet werden.

6. Das Mycelium des Pilzes grenzt also unmittelbar an die letzten Ausläufer des Gefäßbündelsystems, welches ihm Baustoffe und Wasser liefert.

7. Die ganze Galle stellt nicht so sehr ein Nährgewebe, sondern ein großes Wasserreservoir für den Pilz dar. Dieser benötigt infolge seiner ungeschützten oberflächlichen Lage besonders bei der Bildung der Basidien, welche unter Durchbohrung der Cuticula erfolgt, große Wassermengen.

8. Die Gallen der Alpenrosen sind infolge ihres hochorganisierten Baues den Prosoplasmen Küsters zuzuzählen.

Gesamtergebnis.

Wie schon eingangs bemerkt wurde, soll zum Schluß versucht werden, die gewonnenen Resultate nach anatomisch-physiologischen Gesichtspunkten zusammenzustellen. Es müssen zuerst die Veränderungen der Zelle besprochen werden, welche diese infolge ihrer Eigenschaft als Elementarorgan der Pflanze bei Funktionswechsel oder Funktionsverlust erleidet; hierauf ist auf die in den Pilzgallen vorhandenen anatomisch-physiologischen Systeme näher einzugehen.

1. Die Veränderungen der Zelle.

An der einzelnen Zelle können im Falle der Pilzinfektion alle Teile Veränderungen erfahren.

Untersuchungen über den feineren Bau des Cytoplasmas wurden nicht angestellt. Im allgemeinen ist eine Vermehrung desselben, verbunden mit größerer Dichte und Undurchsichtigkeit, an den gereizten Stellen zu konstatieren. Die Massenzunahme des Cytoplasmas erklärt sich jedenfalls aus der durch den Pilz verursachten erhöhten Aktivität der Zelle. Zu einem Schwunde des Plasmas kommt es dort, wo dieses schließlich selbst dem Parasiten als Nährstoff verfällt.

Die äußere Hautschicht des Protoplasten wird überall dort, wo Hyphen (besonders Haustorien) in die Zelle eindringen, eingestülpt, was vielfach mit einem Wachstum derselben verbunden sein dürfte. Der Zweck dieses Vorganges liegt darin, den Protoplasten gegen den Parasiten abzugrenzen und so den Tod der Zelle zu verhindern. Vielfach bildet die Hautschicht aus dem gleichen Grunde in nicht näher untersuchter Weise Zellulose, die die Hyphen ganz oder teilweise einschließt.

Der Zellkern zeigt in den einzelnen Fällen ein ziemlich verschiedenes Verhalten. Ganz allgemein ist eine Größenzunahme zu beobachten, welche entweder ohne Änderung der Gestalt (so in der abgehobenen Epidermis von Capsella) oder unter gleichzeitiger Lappung oder Sprossung (bei Zea Mays und Adoxa), die bis zur Amitose führen kann (Nährgewebe von Capsella), stattfindet. Was die Verteilung des Chromatins betrifft, so läßt sich bei Capsella (Epidermis) und Adoxa eine Anhäufung desselben in Kugelform besonders an der Peripherie konstatieren; dagegen konnte in den gelappten Kernen von Zea Mays das Vorhandensein einer färbbaren

Substanz überhaupt nicht nachgewiesen werden. Chromatinverlust und Schrumpfung des Kernes tritt schließlich bei Adoxa ein, eine Auflösung der Kernmembran wurde bei Capsella (Nährgewebe) und Zea Mays gefunden. Bei Alnus incana scheint der Kern der Epidermiszellen in der Bildung einer »Querplatte« aufzugehen. — Die Nucleolen vergrößern sich, vermehren sich durch Teilung, enthalten meist Vakuolen und sind von großen Höfen umgeben. — Die Veränderungen der Kerne lassen sich zum großen Teile durch die erhöhte Inanspruchnahme erklären. Vor allem hat die Größenzunahme darin ihre Ursache, was sich am deutlichsten bei Zea Mays zu erkennen gibt, wo die Kerne nach Erfüllung ihrer Funktion wieder an Größe abnehmen und sich abrunden. Durch Lappung und Amitose wird aber eine bedeutende Vergrößerung der wirksamen Oberfläche erzielt. Daß Chromatinanhäufungen auch bei normalen Kernen als Folge besonders lebhaften Stoffwechsels auftreten können, hat Rosenberg an gefütterten Drüsenzellen der Tentakeln von Drosera gezeigt. In Mycocecidien beteiligt sich der Kern zunächst an der abnormalen Zellulosebildung, besonders auffallend bei Zea Mays, wo er sich stets an der Stelle der ausgiebigsten Zellulosebildung befindet; ferner müssen in der Zelle die vom Pilz entzogenen Stoffe immer aufs neue ersetzt werden, und dieser beschleunigte Stoffwechsel macht jedenfalls irgendwie die Mitwirkung des Kernes notwendig. Zum Teil sind die Kernveränderungen aber auch Absterbeerscheinungen. Bei Adoxa erklärt sich der Verlust von Kernsaft und Chromatin unmittelbar aus der »Nucleophagie« des Parasiten, das bei Capsella und Zea Mays beobachtete Ausfließen der Kernsubstanzen in das Plasma dürfte das erste Anzeichen des Zugrundegehens der Zellen sein.

Die Zahl der Chromatophoren ist in den Zellen der Pilzgallen oft sehr vermehrt. Vor allem kommen Leukoplaste, dann auch Chloroplaste (Capsella) zur Entwicklung, die ihre normalen Funktionen, aber im Dienste des Parasiten, erfüllen. Bei Adoxa tritt ein teilweiser Funktionsverlust ein, bei Rhododendron wird ihre Ausbildung infolge des Funktionswechsels der Gewebe ganz unterdrückt.

Die Menge des Zellsaftes wird durch die Leistungen der Zellen bedingt: in den Nährgeweben ist er spärlich, in den Wassergeweben reichlich vorhanden. Nicht selten tritt in ihm Anthocyan auf (bei Capsella, aber auch bei Rhododendron und Alnus, wo das Vorkommen dieses Farbstoffes nicht näher untersucht werden konnte, da er durch Alkohol entzogen wird). Im Anschluß an Overton kann man die Färbung vielleicht durch erhöhten Zuckergehalt erklären.

Die Zellmembran erfährt verschiedene Veränderungen. Zunächst wird sie häufig zu erhöhtem Wachstum veranlaßt. Andererseits kommen in vielen Fällen, so besonders in der Epidermis bei den meisten untersuchten Pflanzen, die sekundären Verdickungsschichten nicht zur Ausbildung. Oft unterbleibt die Verholzung, so in den Markstrahlen und der inneren Epidermis der Frucht von Capsella, der Epidermis der Blattaußenseite und den Tracheiden von Zea Mays, ferner überall in den Zellen, welche normalerweise zu Bast oder Sklerenchym (Alnus, Frucht) werden. Die Cutinisierung tritt in den Außenwänden der Epidermen gleichfalls zurück, in andern Fällen findet sie beim Absterben der Zellen statt (Capsella). Partieller Gummosis unterliegen die Membranen bei Zea Mays. Die Tüpfelbildung kann ausbleiben (äußere Epidermis von Zea), oder es können Tüpfel neu entstehen (so in den neu angelegten Siebröhren beim Mais und im Wassergewebe der Rhododendrongallen). Neubildung von Membran endlich findet um intrazelluläre Hyphen statt. — Das Wesentliche in der Veränderung der Zellhaut liegt in der Unterdrückung aller Eigenschaften, die dieselbe widerstandsfähig und undurchlässig machen. Diese wären auch für den Parasiten entschieden unvorteilhaft. Erstens wären sie dem Pilze bei seiner Ausbreitung in der Nährpflanze hinderlich, indem sie nicht nur selbst seinem Angriff Widerstand leisten, sondern auch seinem Vordringen in weitere Gewebe Schranken setzen würden. Zweitens würden sie die Verbreitung der Sporen erschweren oder unmöglich machen. Endlich kann der osmotische Stoffverkehr um so leichter und schneller erfolgen, je zarter die Zellwände sind. Von diesem Gesichtspunkte aus erklärt sich auch das Auftreten von Tüpfeln; daß sie in der äußeren Epidermis von Zea fehlen, ergibt sich einfach daraus, daß ihre Bildung infolge der Zartheit der Membranen überflüssig oder geradezu unmöglich wird. — Die gummöse Veränderung, sowie die Neubildung von Membran um Haustorien sind Schutzmaßregeln der Wirtzelle.

2. Die anatomisch-physiologischen Systeme der Pilzgallen.

Die anatomischen Veränderungen der Gewebe ergeben sich, soweit sie Reizwirkungen sind, insgesamt aus dem durch den Parasiten herbeigeführten Funktionswechsel. Sie sind vor allem danach verschieden, ob die Gewebe in mehr oder minder erwachsenem Zustand vom Pilze befallen wurden, oder schon unter dessen Einfluß

sich aus den Meristemen entwickelten. Im letzteren Falle sind sie besonders weitgehend und ganz den Ansprüchen des Pilzes angepaßt, was sich auch in ihrer korrelativen Ausbildung ausspricht. Die vom Pilze von der Wirtpflanze geforderten Funktionen führen also in dieser zur Schaffung anatomisch-physiologischer Systeme. Diese sind vor allem: ein Hautsystem, Leitungssystem, Speichersystem und Durchlüftungssystem. Andere Systeme kommen wenig oder gar nicht in Betracht.

a) Das Hautsystem.

Das Hautsystem wird in den meisten Fällen durch die Epidermis gebildet. Von den Funktionen derselben ist diejenige, als Schutzorgan gegen zu starke Transpiration zu dienen, gleich notwendig wie in normalen Pflanzenteilen. Demgemäß ist auch immer eine mehr oder minder starke Cuticula entwickelt. Die mechanische Funktion der Epidermis dagegen, nämlich eine schützende Haut gegen Einwirkungen von außen her zu bilden, tritt in den Gallen deshalb in den Hintergrund, weil mit ihr das Bedürfnis des Pilzes, die Epidermis schwach zu erhalten, um ihr leichtes Zerreißen bei der Bildung und Zerstreuung der Sporen zu ermöglichen, in Konflikt gerät. Was die Ausbildung ihrer Elemente betrifft, ist auf das früher (bei der Besprechung der Zellhaut) diesbezüglich Gesagte zu verweisen. Hier ist noch zu betonen, daß auch die Verzahnung und Verkeilung der Epidermiszellen unterbleibt. Dagegen tritt in den Gallen häufig eine andere Funktion der Epidermis, nämlich einen »Wassergewebsmantel« zu bilden, in den Vordergrund. Auch diese führt zur Unterdrückung mechanischer Charaktere, was besonders deutlich in der Epidermis der Fruchtinnenseite von Capsella zu beobachten ist. — Korkbildung habe ich nirgends gefunden; doch kann das am Stengel von Capsella auftretende, von Pilz und Wirt gebildete Vernarbungsgewebe, da es die Funktionen der verloren gegangenen Epidermis erfüllt, als sekundäres Hautgewebe bezeichnet werden.

b) Das Leitungssystem.

Das Leitungssystem ist in den Gallen meist sehr stark entwickelt, und zwar kann entweder nur die Zahl der Elemente in den Bündeln vermehrt sein, oder es können weitere, akzessorische Bündel zur Ausbildung kommen. Es erklärt sich dies daraus, daß in der Regel die Nährstoffe für den Parasiten nicht in den Gallen selbst (durch Assimilation) erzeugt werden, also zugeleitet werden müssen. Die

Zusammensetzung der Bündel richtet sich nach den Ansprüchen des Pilzes: wo dieser vor allem plastische Baustoffe verlangt, ist das Leptom vorherrschend (Alnus) oder allein vorhanden (Zea Mays). Benötigt er aber in größerer Menge Wasser, so findet eine Vermehrung der Hadromelemente statt (Rhododendron). Werden akzessorische Bündel gebildet, so ist ihre Anordnung eine derartige, daß sie zu den Orten größten Stoffverbrauches, d. i. zu den Orten der Sporenbildung des Pilzes, führen. (Am deutlichsten bei Zea Mays und Rhododendron, aber auch in den Früchten von Capsella und Alnus.) Was die Elemente der Bündel betrifft, so fällt vor allem die Stellvertretung der Tracheen durch Tracheiden auf. Auch diese »Hemmungsbildung« (Küster, S. 34) dürfte sich auf einen Funktionswechsel zurückführen lassen. Vielleicht erklärt sie sich daraus, daß nicht so sehr eine rasche Leitung des Wassers als eine Speicherung desselben in größerer Menge notwendig ist.

c) Das Speichersystem.

In allen Gallen werden an bestimmten Stellen Reservestoffe gespeichert, die für den Lebensunterhalt des Pilzes dienen. Die derart zustande kommenden Speichergewebe nehmen meist den größten Teil der Galle ein. Sie dienen teils zur Ansammlung von Baustoffen (Nährgewebe), teils fungieren sie als Wasserbehälter (Rhododendron). Die Nährgewebe bestehen aus parenchymatischen, meist sehr zartwandigen Zellen, die in großer Menge Stärke, jedenfalls aber auch gelöste Kohlehydrate enthalten. Als stickstoffhaltiger Reservestoff kommt das reichlich vorhandene Plasma in Betracht. — Das Wassergewebe von Rhododendron, gleichfalls ein zartwandiges Parenchym, ist durch den Reichtum an Zellsaft und das »blasebalgähnliche Spiel« seiner Elemente ausgezeichnet. Daß für die Ausbildung des Speichersystems ausschließlich physiologische Gründe maßgebend sind, zeigt sich darin, daß seine Herkunft eine ganz verschiedene sein kann. Im Blatte leitet es sich meist vom Palisadengewebe und Schwammparenchym ab, in den Achsen beteiligen sich an seiner Bildung Rinde, Markstrahlen und Mark. Aber auch an Stelle der mechanischen Zellen (von Bast und Sklerenchym) können überall infolge des eintretenden Funktionswechsels Bestandteile von Speichergeweben entstehen, ebenso aus Elementen der Gefäßbündel, schließlich auch aus der Epidermis.

d) Das Durchlüftungssystem.

Eine besonders starke Durchlüftung der Gallen scheint nicht notwendig zu sein. Überall ist in ihnen die entschiedene Tendenz zur Unterdrückung der Interzellularen bemerkbar. Es handelt sich eben größtenteils um Speichergewebe, und in solchen fehlen auch dort, wo sie als normale Bestandteile der Pflanze auftreten, größere Luftwege. Bezüglich der Spaltöffnungen verhalten sich die einzelnen Fälle verschieden. Daß an den Gallen von Rhododendron überhaupt keine vorhanden sind, ist begreiflich, da sie die Funktion des Wassergewebes beeinträchtigen würden. Bei Zea wird ihre Zahl verringert, indessen ist dies vielleicht nur scheinbar der Fall, da sie bei der Gallbildung über eine viel größere Fläche verteilt sind. Keinesfalls aber sind sie vermehrt, dagegen dienen sie der Durchlüftung viel ausgiebiger als die normalen, da sie keine Zentralspalten, sondern große Luftlöcher darstellen. Die normale Funktion der Schließzellen ist dabei ganz unterdrückt worden. Für das Auftreten von Spaltöffnungen an der Fruchtinnenwand von Capsella und Alnus, wo sie normalerweise fehlen, kann vorderhand eine Erklärung nicht gegeben werden.

e) Die übrigen Systeme.

Ein Assimilationssystem fehlt den Gallen in der Regel, da ihnen die anderwärts erzeugten Baustoffe zugeleitet werden. Nur bei Capsella werden diese wenigstens zum Teil an den Stellen der Infektion selbst gebildet, zu welchem Zweck es in letzteren zu erhöhter Chlorophyllbildung kommt.

Das mechanische System tritt in den Gallen aus mehrfach erwähnten Gründen ganz zurück. Die Festigkeit der Gallen wird meist nur durch den Turgor hergestellt.

Exkretbehälter finden sich, wenn sie auch in der normalen Pflanze auftreten. Bei Alnus hat die Zahl und Größe der Drusen von oxalsauerm Kalk zugenommen, an anderer Stelle aber fällt die Bildung von Einzelkristallen aus.

Als totes passives Bewegungsgewebe kann vielleicht die abgehobene Epidermis von Capsella infolge ihres Aufspringens bezeichnet werden.

Literaturverzeichnis.

Brefeld, O., Untersuchungen aus dem Gesammtgebiete der Mykologie. Bd. V, XI und XII (Brandpilze). 1883 und 1895.

de Bary, A., Morphologie und Biologie der Pilze. Leipzig 1884.

Fischer von Waldheim, A., Beiträge zur Biologie und Entwickelungsgeschichte der Ustilagineen. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. VII. 1869—70.

Fockeu, M., Note pour servir à l'histoire de la mycocécidie des Rhododendrons. Revue biologique du Nord de la France. VI. 1894.

Geyler, H. Th., Exobasidium Lauri n. sp., als Ursache der sog. Luftwurzeln von Laurus Canariensis. Botan. Zeitung. 1874.

Groom, P., On Thismia Aseroe (Beccari) and its Mycorrhiza. Annals of Botany. Vol. IX. 1895.

Haberlandt, G., I. Physiologische Pflanzenanatomie. 3. Aufl. Leipzig 1904.

II. Über die Beziehungen zwischen Funktion und Lage des Zellkerns bei den Pflanzen. Jena 1887.

Janse, Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. Ann. du Jard. botanique de Buitenzorg. Vol. VI. 1886.

Klebs, G., Über den Einfluss des Kernes auf die Bildung der Zelle. Biol. Centralblatt. VII. 1887.

Knowles, E. J., A study of the abnormal structures induced by Ustilago Maydis. Journal of Mycology. Vol. IV. 1889.

Küstenmacher, M., Beiträge zur Kenntnis der Gallbildungen mit Berücksichtigung des Gerbstoffes. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXVI. 1895.

Küster, E., Pathologische Pflanzenanatomie. Jena 1903.

Leitgeb, M. H., Completoria complens Lohde, ein in Farrnprothallien schmarotzender Pilz. Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wiss. Wien. I. Abth. Bd. LXXXIV. Juli-Heft. Jahrg. 1881.

Magnus, W., Studien an der endotrophen Mykorrhiza von Neottia Nidus avis. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXXV. 1900.

Miyoshi, M., Über Chemotropismus der Pilze. Botan. Zeitung. 1894.

Molliard, M. M., I. Recherches sur les cécidies florales. Ann. d. sciences naturelles. VIII. Série. Botanique. T. I. 1895.

II. Sur les caractères anatomiques de quelques Hémiptérocécidies foliaires. Miscell. biolog. dédiées au prof. Giard. Paris 1899.

III. Sur quelques caractères histologiques des cécidies produites par l'Heterodera radicicola Greef. Revue générale de Botanique. T. XII. 1900.

IV. Hypertrophie pathologique des cellules végétales. Rev. gén. de Botanique. T. IX. 1897.

V. Notes de Pathologie végétale. Rev. gén. de Botanique. T. X. 1898.

Němec, B., Über die Mykorrhiza bei Calypogeia trichomanis. Beihefte z. Botan. Centralblatt. Bd. XVI. Heft 2. 1904.

Overton, E., Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei den Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXXIII. 1899.

Peglion, Studio anat. di alc. ipertrofie indotte dal Cystopus candidus in alc. organi di Raphanus Raphanistrum. Riv. pat. veg. Vol. I. 1892.

Peters, Untersuchungen über den Zellkern in den Samen während ihrer Entwickelung, Ruhe und Keimung. Rostock 1891.

Rosen, F., Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenzelle, I. und II. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. V. 1892, und Bd. VI. 1893.

Rosenberg, O., Physiologisch-cytologische Untersuchungen über Drosera rotundifolia. Upsala 1899.

Sadebeck, R., Die parasitischen Exoasceen. Hamburg 1893.

Shibata, K., Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXXVII. 1902.

Smith, W. G., Untersuchung der Morphologie und Anatomie der durch Exoasceen verursachten Spross- und Blatt-Deformationen. Forstl. naturw. Zeitschrift. III. Jahrg. 1894.

Solms-Laubach, H., Graf zu, Ustilago Treubii Solms. Ann. du Jardin. botan. de Buitenzorg. Vol. VI. 1886.

Strohmeyer, O., Anatomische Untersuchung der durch Ustilagineen hervorgerufenen Missbildungen. Inaug.-Diss. Erlangen 1896.

Tischler, G., Über Heterodera-Gallen an den Wurzeln von Circaea lutetiana L. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. XIX. Jahrg. 1901.

Townsend, C. O., Der Einfluss des Zellkerns auf die Bildung der Zellhaut. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXX. 1897.

Tubeuf, K., Freiherr von, Pflanzenkrankheiten, durch kryptogame Parasiten verursacht. Berlin 1895.

Wakker, J. H., Untersuchungen über den Einfluss parasitischer Pilze auf ihre Nährpflanzen. Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXIV. 1892.

Weber, C., Über den Pilz der Wurzelanschwellungen von Juncus bufonius. Botan. Zeitung. Bd. XLII. 1884.

Wolff, R., Der Brand des Getreides usw. Halle 1874.

Wörnle, P., Anatomische Untersuchung der durch Gymnosporangium-Arten hervorgerufenen Missbildungen. Forstl. naturw. Zeitschrift. Jahrg. III. 1894.

Woronin, M., Exobasidium Vaccinii. Ber. über d. Verhandl. d. naturf. Ges. zu Freiburg i. B. Bd. IV. 1867.

Zacharias, Über das Verhalten des Zellkerns in wachsenden Zellen. Flora. Bd. LXXXI. Ergänzungsband 1895.

Erklärung der Abbildungen.

Für die stärkeren Vergrößerungen wurde ein Objektiv von Leitz, homog. Imm. $^1/_{12}$ unter Benutzung verschiedener Okulare angewendet.

Albugo candida auf Capsella Bursa pastoris.

Tafel I.

Fig. 1. Normaler Kern aus dem Rindenparenchym eines Fruchtstieles. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.

Fig. 2. *a—d* Kerne aus dem Rindenparenchym eines infizierten Fruchtstieles. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.

Fig. 3. Zelle aus dem Rindenparenchym eines infizierten Fruchtstieles. Der Deutlichkeit halber sind nur Plasma und Kerne eingetragen. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.

Fig. 4. Querschnitt durch die infizierte Achse. Erste Anlage eines Conidienlagers durch subepidermale Hyphen, welche Haustorien (*h*) in die Epidermis entsenden. Das Haustorium stülpt den Protoplasten ein. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 570.

Fig. 5. Dasselbe, älteres Stadium. Die Conidienträger (*c*) sind angelegt, das Haustorium ist abgerissen und in Zellulose eingehüllt worden. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 570.

Fig. 6. Querschnitt durch die abgehobene Epidermis der Achse mit den anklebenden ersten Conidien des Pilzes. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 570.

Fig. 7. Oberflächenansicht der abgehobenen Epidermis der Achse bei Einstellung auf den Grund der Zellen. *h* die von Zellulose umgebenen Haustorien. Vergr. 370.

Fig. 8. Dasselbe von der Blattoberseite von Arabis ciliata. Vergr. 370.

Fig. 9. Querschnitt durch die abgehobene Epidermis der Blattoberseite von Arabis ciliata mit eingehüllten Haustorien (*h*). Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 625.

Fig. 10. *a* Kern der normalen, *b* der abgehobenen Epidermis des Stengels. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000. (Diese und die folgenden Figuren beziehen sich wieder auf Capsella.)

Fig. 11. Oberflächenansicht der abgehobenen Stengelepidermis an der Rißstelle einer Blase. Die verschleimten Mittellamellen haben sich mit Hämatoxylin dunkel gefärbt. *c* Cuticula. Vergr. 370.

Fig. 12. Querschnitt durch die verquollene Epidermis der Achse. Vergr. 625.

Fig. 13. Querschnitt durch die normale Epidermis der Achse. Vergr. 625.

Fig. 14. Querschnitt durch den äußersten Teil des Vernarbungsgewebes des Stengels. *h* Hyphen, *c* Conidienträger, *r* das zugrunde gegangene Rindenparenchym. Vergr. 570.
Fig. 15. Oberflächenansicht der Epidermis der normalen inneren Fruchtwand. Vergr. 625.
Fig. 16. Dieselbe Epidermis im Querschnitt. Vergr. 625.
Fig. 17. Oberflächenansicht der Epidermis der Innenwand einer infizierten Frucht mit Spaltöffnungen. Vergr. 625.
Fig. 18. Dieselbe Epidermis im Querschnitt. Vergr. 625.

Exoascus amentorum auf Alnus incana.

Fig. 19. Querschnitt durch die normale Deckschuppe. Vergr. etwa 20.
Fig. 20. Querschnitt durch die infizierte Deckschuppe. Vergr. etwa 20.
Fig. 21. Querschnitt durch die Mitte der normalen Frucht. Vergr. etwa 20.
Fig. 22. Querschnitt durch die Mitte der infizierten Frucht. Vergr. etwa 20.
In Fig. 19, 20 und 22 ist das Hadrom schraffiert, in Fig. 21 ist schwarz gehalten.
Fig. 23. Querschnitt durch die Epidermis einer infizierten Schuppe zu Beginn der Ascusbildung. Entstehen der »Querplatten«. Frbg. Methylgrün-Essigsäure. Vergr. 800.

Tafel II.

Fig. 1. Eine infizierte Deckschuppe mit zwei gleichfalls infizierten Früchten (*f*). Natürliche Größe.
Fig. 2. Oberflächenansicht der inneren Epidermis einer infizierten Frucht mit Spaltöffnung. Vergr. 800.
Fig. 3. Dieselbe Epidermis aus einer normalen Frucht. Vergr. 625.
Fig. 4. Querschnitt durch ein akzessorisches Gefäßbündel der erkrankten Frucht. Bhdlg. Eau de Javelle. Vergr. 800.

Ustilago Maydis auf Zea Mays.

Fig. 5. Epidermis der Innenseite eines Hüllblattes bei mittlerer Einstellung. Eine intrazellulare Verbreitungshyphe (*h*) dringt durch die Zellwand (*m m'*) in eine neue Zelle. *s* die Zellulosescheide. Vergr. 1000.
Fig. 6. Eine teilweise umscheidete Verbreitungshyphe mit drei Flickstellen aus dem Blattparenchym. *h* ein abzweigendes Haustorium. Vergr. 1000.
Fig. 7. Verbreitungshyphe aus der Epidermis der Innenseite eines Hüllblattes nach vollendeter Scheidenbildung. Vergr. 570.
Fig. 8. Epidermiszelle der Innenseite eines Hüllblattes bei mittlerer Einstellung. *h* Haustorium. Vergr. 625.
Fig. 9. Verbreitungshyphe aus derselben Epidermis, deren weiteres Vordringen durch starke Zellulosebildung verhindert wird. *m m'* die Zellwand. Vergr. 1000.
Fig. 10. Bildung eines Zelluloseknopfes an einer Rißstelle; aus derselben Epidermis. Vergr. 1000.
Fig. 11. Querschnitt durch ein Gefäß der Infloreszenzachse mit umscheideter Hyphe. Vergr. 570.

Fig. 12. Umscheidete Verbreitungshyphe aus dem Blattparenchym, am oberen Ende sich zur Sporenbildung anschickend. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 1000.
Fig. 13. Kerne aus der normalen Epidermis der Innenseite eines Hüllblattes. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.
Fig. 14. Kerne aus den Zellen der Gallgrenzen. *a, b, c* aus der Epidermis der Innenseite, *d* aus dem Blattparenchym. Vergr. 1000.
Fig. 15. Kerne aus derselben Epidermis an Stellen starker Gallbildung. Bei *a* ein Haustorium (*h*). Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.
Fig. 16. Bildung eines Procambiums in den subepidermalen Zellschichten des infizierten Hüllblattes. Längsschnitt. Vergr. 1000.
Fig. 17. Teil eines Längsschnittes durch ein akzessorisches Leitbündel aus demselben Gewebe. *s* Siebröhren. Vergr. 1000.
Fig. 18. Tracheiden aus dem Hadrom eines an eine Galle grenzenden Gefäßbündels. Vergr. 370.
Fig. 19. Querschnitt durch die weitgeöffnete Spaltöffnung einer Galle an der Blattunterseite. Vergr. 800.

Tafel III.

Fig. 1. Epidermis der Innenseite eines normalen Hüllblattes mit zweierlei Spaltöffnungen. Vergr. 370.
Fig. 2. Abnorme Spaltöffnung aus derselben Epidermis eines erkrankten Blattes. Vergr. 570.
Fig. 3 und 4. Spaltöffnungen mit vier Schließzellen aus derselben Epidermis. Vergr. 570.
Fig. 5. Normale Epidermis der Blattaußenseite. Vergr. 370.
Fig. 6. Querschnitt durch dieselbe Epidermis. Vergr. 1000.
Fig. 7. Epidermis einer Galle auf der Blattaußenseite. Vergr. 370.
Fig. 8. Spaltöffnung aus derselben Epidermis. Vergr. 370.
Fig. 9. Spaltöffnung aus derselben Epidermis an der Grenze der Galle. Vergr. 570.
Fig. 10. Spaltöffnung derselben Epidermis im Querschnitte mit verstopfter Atemhöhle. Vergr. 625.

Tafel IV.

Fig. 1. Verschlossene Spaltöffnung aus der infizierten Blattinnenseite. Vergr. 625.
Fig. 2. Spaltöffnung aus derselben Epidermis. Vergr. 370.
Fig. 3. Aufgerissene Spaltöffnung aus der Epidermis der Blattaußenseite. Mit Wandverdickung. Vergr. 370.
Fig. 4. Dasselbe, ohne Wandverdickung. Vergr. 370.
Fig. 5. Spaltöffnung der Epidermis des infizierten Kolbens. Vergr. 625.

Puccinia Adoxae auf Adoxa Moschatellina.

Fig. 6. Anlage eines Haustoriums und Zellulosebildung. Aus einem Tangentialschnitt durch die Rinde des Stengels. Vergr. 1000.
Fig. 7. Längsschnitt durch eine Rindenzelle mit Haustorien. *s* Zellulosescheide, *l* Leukoplaste. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 800.

Fig. 8. Kerne aus dem Rindenparenchym, von Haustorien angegriffen, umschlungen und deformiert. *a*—*e*, ferner *g* und *h* jüngere Stadien. *f*, *i* und *k* ältere Stadien. Frbg. Boraxkarmin, z. T. Fuchsin-Methylenblau. Vergr. 1000.

Fig. 9. Normaler Kern aus dem Rindenparenchym eines gesunden Stengels. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1200.

Fig. 10. Gelappter Kern aus dem Rindenparenchym eines infizierten Stengels vor dem Angriff durch die Haustorien. Frbg. Boraxkarmin. Vergr. 1000.

Fig. 11. Stärkekörner aus der normalen Rinde. Vergr. 1000.

Fig. 12. Längsschnitt durch eine Zelle aus dem Rindenparenchym eines Blattstieles von Alchemilla vulgaris mit einem Haustorium von Uromyces Alchemillae. *s* Scheide. Frbg. Methylenblau. Vergr. 1000.

Exobasidium Rhododendri auf Rhododendron ferrugineum.

Fig. 13. Wassergewebe an der Peripherie einer jungen Galle nach Wasserentzug durch Alkohol. Das Mycelium des Pilzes ist in seiner Lage durch Schraffen angedeutet. Vergr. 525.

Fig. 14. Blatt mit Gallapfel, von oben betrachtet. Der Ansatzstelle *a* der Galle streben vier dicke Nerven zu. Nat. Gr.

Fig. 15. Längsschnitt durch die Mitte eines Gallapfels mit dem (etwas schematisierten) Gefäßbündelverlauf. Schwach vergr.

Fig. 16. Mediane Längsschnitte durch ein ganz infiziertes Blatt: *a* parallel zur Oberfläche, *b* senkrecht zu dieser. Nat. Gr.

Fig. 17. Tracheiden aus dem Längsschnitt eines zu einer Blattgalle führenden Gefäßbündels. Vergr. 370.

Fig. 18 und 19. Letzte Endigungen der Gefäßbündel aus einer Blattgalle. Eau de Javelle-Behandlung durch 30 Stunden. In Fig. 19 ist das Pilzmycel, durch die Lauge gänzlich zerstört, eingetragen (*s* die erhalten gebliebenen Zellulosescheiden der Haustorien), in Fig. 18 ist es durch Schraffen ersetzt. Vergr. 525.

Fig. 20. Querschnitt durch ein akzessorisches Gefäßbündel an der Peripherie einer Galle. Vergr. 525.

Fig. 21. Oberfläche einer Galle. Zwei Basidien dringen durch die Mittellamelle einer Radialwand der Epidermis (*m m'*) nach oben. Vergr. 1000.

Fig. 22. Haustorien des Pilzes aus der Rinde der Gallen: *b* ohne Scheide, *a* mit beginnender Scheidenbildung, *c* und *d* mit fertiger Scheide (*s*). Vergr. 1000.

Fig. 23. Oberflächenansicht der Epidermis einer sehr jungen Galle. Bhdlg. Chlorzinkjod. Vergr. 370.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.

v. Guttenberg, Anatomie der Pilzgallen.

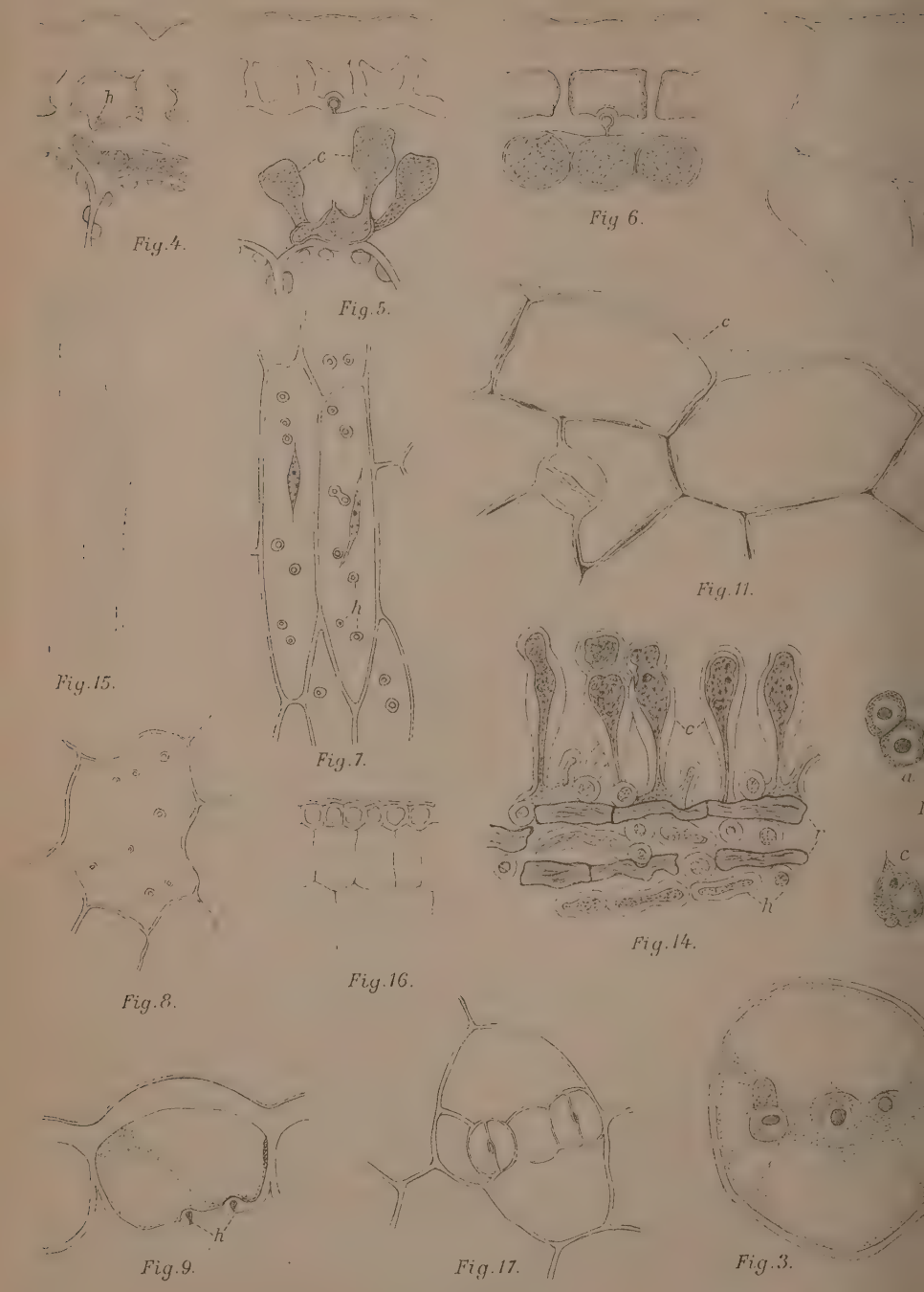


Fig. 4. Fig. 5. Fig 6. Fig. 11. Fig. 15. Fig. 7. Fig. 14. Fig. 8. Fig. 16. Fig. 9. Fig. 17. Fig. 3.

H.v. Guttenberg gez.

Verlag v. Wilhelm

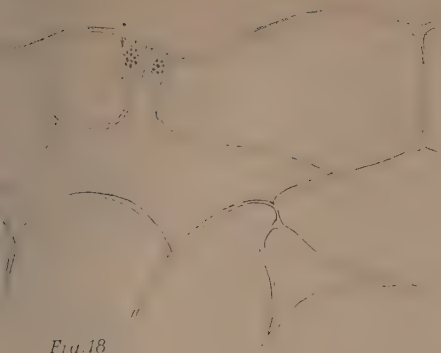


Fig. 18

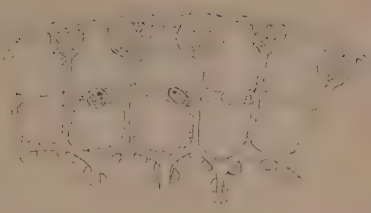


Fig. 23.

Fig. 22.

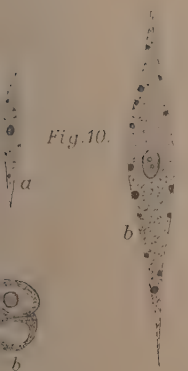


Fig. 10.

Fig. 20.

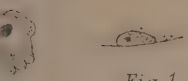


Fig. 1.

Fig. 13.

Fig. 19.

Fig. 21.

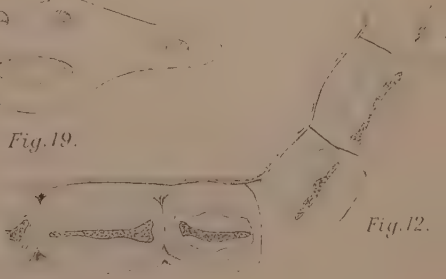


Fig. 12.

Lith. Anst. Julius Kunkhardt, Leipz

Fig. 1

Fig. 2.

Fig. 3

Fig. 12.

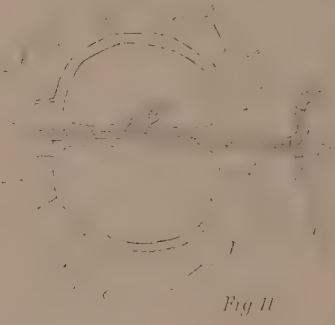


Fig 11

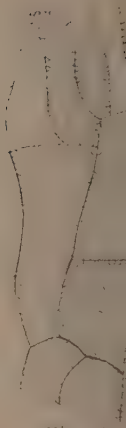


Fig. 18.

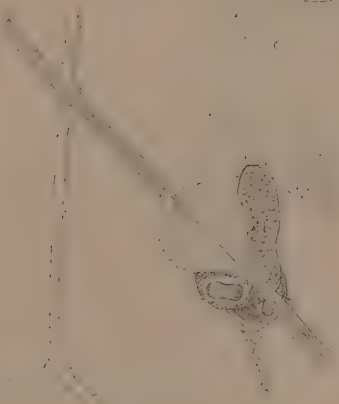


Fig 10

Fig. 14 a.

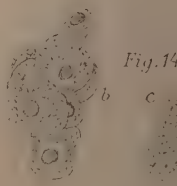


Fig. 14

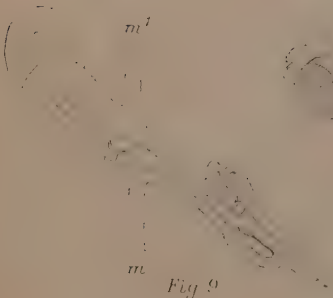


Fig 9

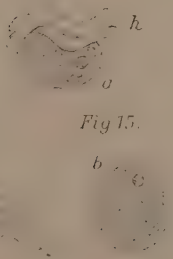


Fig 15.

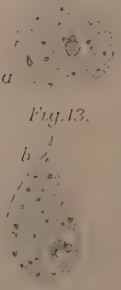


Fig. 13.

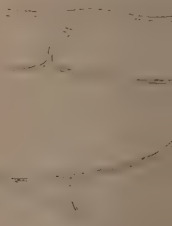


Fig. 4.

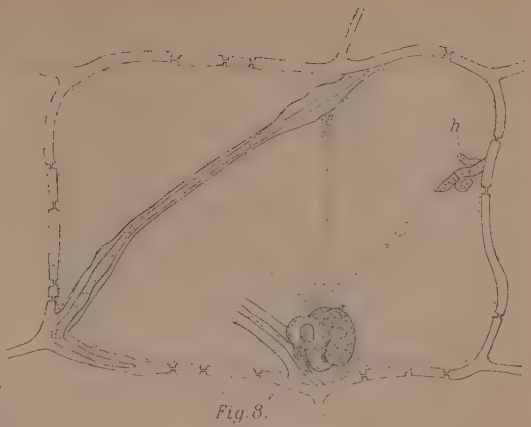


Fig. 8.

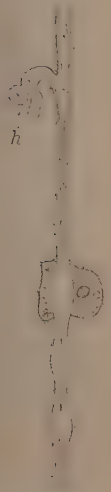


Fig. 6.

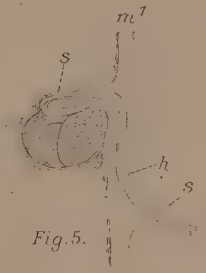


Fig. 5.

Fig. 7.

Fig. 16.

Fig. 14d.

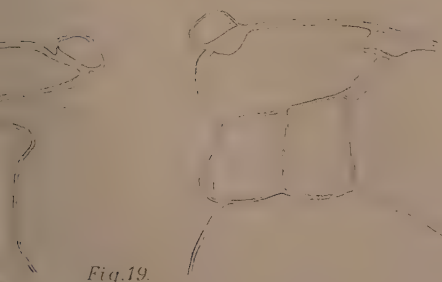


Fig. 19.

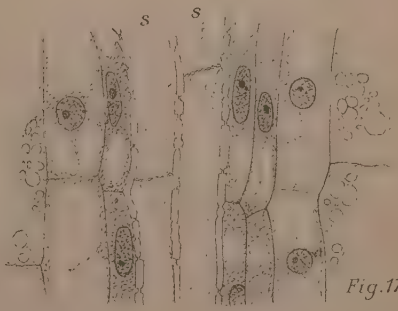


Fig. 17.

Lith. Anst. Julius Klinkhardt, Leipzig.

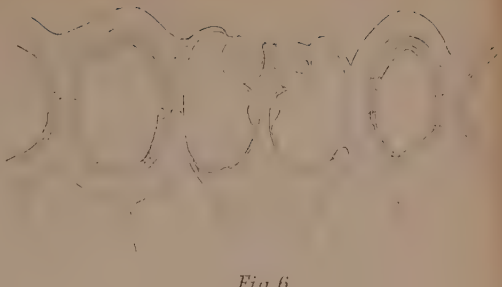


Fig. 6.

Fig. 9.

Fig. 3.

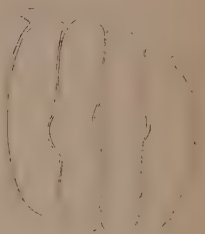


Fig. 4.

Fig. 10.

Fig. 2.

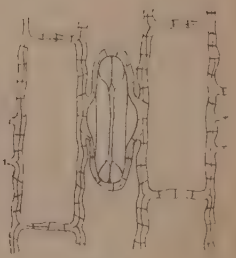


Fig. 5.

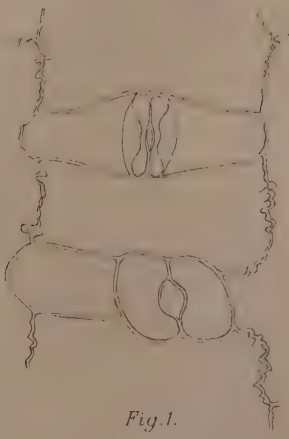


Fig. 1.

Fig. 8.

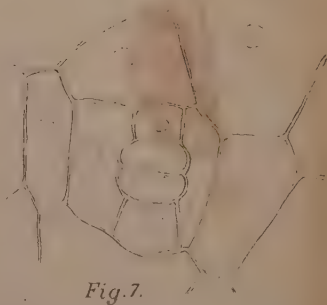


Fig. 7.

H.v. Guttenberg gez. Verlag von Wilhelm Engelmann in Leipzig. Lith. Anst. Julius Klinkhardt, Leipzig.

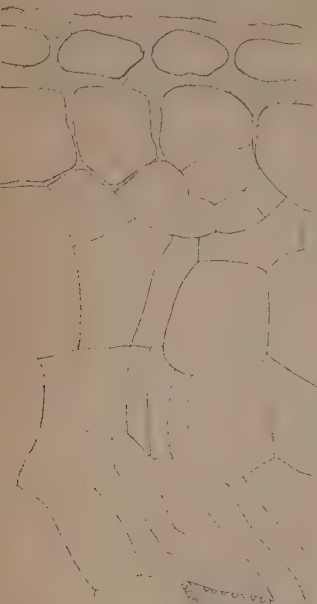


Fig. 23.

Fig. 18.

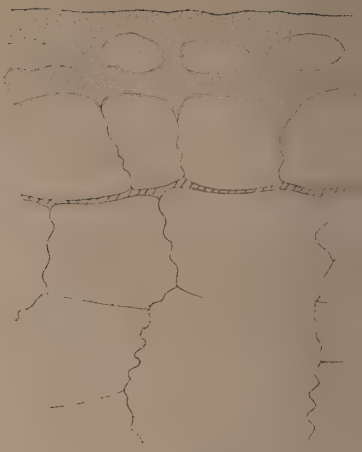


Fig. 13.

Fig. 14.

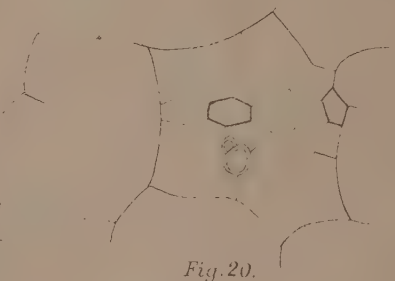


Fig. 20.

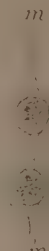


Fig.

Fig. 16.

Fig. 15.

Fig. 11.

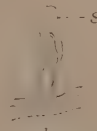


Fig. 22.

Fig. 3.

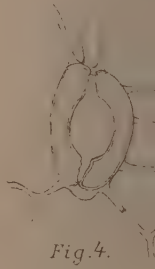
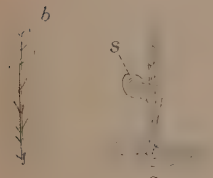


Fig. 4.



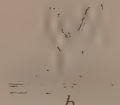


Fig. 22.

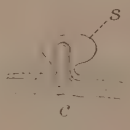


Fig. 2.

H.v.Guttenberg gez.

... Wilhelm

Fig. 19

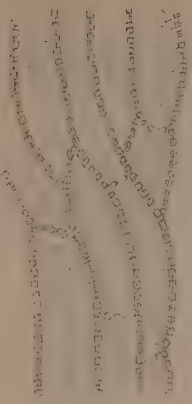


Fig. 17

Fig. 7.

Fig. 9.

Fig. 8a.

Fig. 10.

Fig. 5.

Fig. 8.

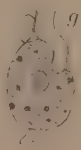


Fig. 1.

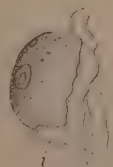


Fig. 8.

Fig. 12.

Fig. 6.

Lith Anst. Julius Klinkhardt, Leip

E W Bull

BULLETIN No. 91 FEBRUARY 1, 1911

Delaware College

Agricultural

Experiment Station

The Relation of Parasitic Fungi

TO THE

Contents of the Cells of the Host Plants

(I. The Toxicity of Tannin)

By

MELVILLE THURSTON COOK, Ph. D.

Assisted by J. J. TAUBENHAUS, M. S.

Newark, Delaware

Delaware College
Agricultural Experiment Station

BOARD OF CONTROL

THE AGRICULTURAL COMMITTEE.

MEMBERS OF THE COMMITTEE.

GEO. G. KERR *Chairman*.....*Newark, Del.*
DANIEL W. CORBIT .....*Odessa, Del.*
SAMUEL H. DERBY .....*Woodside, Del.*
SAMUEL H. MESSICK .....*Bridgeville, Del.*
JOS. H. HOSSINGER .....*Newark, Del.*

STATION STAFF.

HARRY HAYWARD .....*Director*
CHARLES F. DAWSON .....*Veterinarian*
CHARLES A. McCUE.....*Horticulturist*
MEL T. COOK .....*Plant Pathologist*
ARTHUR E. GRANTHAM .....*Agronomist*
FIRMAN THOMPSON .....*Chemist*
LOTTIE W. BAKER .....*Secretary*
JACOB J. TAUBENHAUS.....*Ass't Plant Pathologist*
H. P. BASSETT .....*Ass't Chemist*
H. H. MORGAN .....*Ass't Chemist*

The Station bulletins are published quarterly, and distributed free of expense to those who request the same.

All communications should be addressed

AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION,
Newark, Del.

MELVILLE THURSTON COOK, PH. D.,

ASSISTED BY

J. J. TAUBENHAUS, M. S.

(I. TANNIN.)

The immunity of certain plants to disease is a most interesting question which, with development of plant breeding, has become an important field for research. However, the majority of workers up to the present time have been much more interested in the development of immune strains than in efforts to determine the factors which induced the desired immunity.

The examination of almost any field, orchard, garden, or vineyard, in which a disease is prevalent, will usually result in finding one or more healthy individuals and it is well known that certain varieties are more resistant than others, but the grower is frequently led to use the less resistant varieties because they possess other qualities which are necessary for a profitable crop. It is also well known that resistant individuals, varieties and species are more common among the uncultivated than among cultivated plants.

The appearance of individuals and varieties of plants which were more or less immune to the ravages of disease have attracted the attention of plant pathologists, plant breeders, and practical agriculturists for many years, but very little data has been secured to explain why they possess this characteristic while other individuals or closely related varieties or species are suspectible. This so-called "constitutional susceptibility" or "predisposition to disease" has been attributed to the long cultivation and breeding of the species or varieties in question, thus lowering their vitality and making them less resistant.

There are two evident points of attack on this problem which have received some attention from the various workers, (a) the characters of the cell wall, more especially of those cells which form the epidermal structures and, (b) the contents of the cells. The first of these in-

volves the morphological character and the second involves the physiological properties of the host plants. Very naturally and in accordance with the progress of botanical studies, the first of these attracted the attention of workers long before the other. However, the majority of investigators are now inclined to believe that the character of the cell wall is of very little, if any importance, and that whatever significance may be attached to its character is secondary.

H. Marshall Ward[1] in discussing immunity in connection with experiments which involved measurements and counting of stomata, hairs, etc., says that he was "clearly led to the conclusion that the matter has nothing to do with anatomy, but depends entirely on physiological reactions of the protoplasm of the fungus and of the cells of the host."

"In other words, infection and resistance to infection depend on the power of the fungus protoplasm to overcome the resistance of the cells of the host by means of enzymes or toxins; and, reciprocally on that of the protoplasm of the cells of the host to form anti-bodies which destroy such enzymes or toxins, or to excrete chemotactic substances which repel or attract the fungus-protoplasm."

In discussing *Puccinia dispersa*[2] in connection with Bromes he says, "In these cases it seems that the infection tubes reach and penetrate the stomata but are unable to form a mycelium in the tissues, evidently because the living cells are really resistant. How these latter prevent the hyphæ from putting haustoria into their cell-cavities is not clear, but it looks as if they exerted some deleterious influences on the delicate tips and this brought their efforts to abortion."

"It is evident that some factor or factors on the part of the host plant must be concerned in rendering infection successful, or the reverse; because as we have seen, even when the external conditions are favorable to germination, and even when spores have successfully germinated on the leaf, and the germ tubes reached the stomata, infection only follows in the case of certain species or varieties while others are resistant if not immune."

After giving a discussion of the structural characters of the Bromes, he says that the resistance is not due to the structure "but to

1. H. Marshall Ward—"Recent Researches on the Parasitism of Fungi." Ann. of Botany 19:1-54 (1905).

2. H. Marshall Ward—"On the Relations Between Host and Parasite in the Bromes and their Brown Rust, *Puccinia dispersa* (Eriks). Ann. of Botany, 16:233-315 (1902).

internal, *i. e.*, intra-protoplasmic properties beyond the reach of the microscope, and similar in their nature to those which bring about the essential differences between species and varieties themselves."

Massee[1] defines "an immune plant as an individual in which the positive chemotactic substances, necessary for facilitating the entrance of the germ tubes of a given parasitic fungus into its tissues, is absent."

He also says, "Now, with a clearer knowledge as to what constitutes immunity, it follows that the modifications required to attain this desired object are physiological rather than morphological; and the first step must necessarily be the determination of the exact constituents of the cell sap, exercising a chemotactic influence over the germ tubes of the parasitic fungi."

Some years ago the writer's attention was attracted to the large amount and disposition of tannin in vegetable galls which were the result of insect injuries. Still later studies of the galls caused by fungi and on the diseases of coffee in Cuba convinced the writer that the substances within the cells of the host plants had a very definite relation to the parasites. As a result of these studies it was decided to begin an extensive series of experiments on both parasitic and saprophytic fungi which live on plant foods and to study them in relation to the various substances with which they come in contact, as foods and otherwise.

Tannin was selected as the first of these substances because it occurs in such great quantities, is widely distributed throughout the plant kingdom, and is so prominent in diseased or injured tissues. Experimental work with other substances is now in progress.

Tannin has been studied extensively by both the chemist and the pharmacologist, but has received very little attention from the botanist. In the great majority of botanical works it is referred to as being merely a waste product, although many writers have referred to it in connection with other substances as being a possible protection against disease, insects, etc., but none so far as the writer knows, have carried on definite experimental work to determine its real functions in the living plant. Even Ward and Massee in their epoch-making studies on the relation between host and parasite, origin of parasitism in fungi, predisposition and immunity, etc., and Miyoshi on "Ueber Chemotro-

1. Massee, George—"On the Origin of Parasitism in Fungi."

pisms de Pilze," did not take this abundant and widely distributed substance into consideration.

Tannin has been used to some extent as a germicide, but has proved rather unsatisfactory, which may be due to its association with other substances and to its being so readily soluble in water that it is usually removed from the surface to which it has been applied.

Tannin is said to occur in practically all parts of the plant, but reaches its maximum in the bark of trees and in the seed and ovary coats. It is especially prominent in diseased and injured parts of plants, such as insect galls, fungus galls, leaf spots, etc. It varies in amount in different parts of the plant and at different seasons of the year. It appears to be especially abundant in plants at the period of greatest growth. Trimble[1] says that in *Geranium maculatum* it is present in greatest quantity in April, just before the plant blooms, and that it decreases to a minimum in October. It also increases in amount in generating seeds. It also differs in different plants, but all tannins from whatever source have many properties in common. These different tannins are known to commerce by different trade names. Tannin from healthy plants is frequently referred to as physiological tannin, while the tannin from diseased parts, such as galls, is referred to as pathological tannin. The best known of these commercial products is the gallotannic acid (C^{14} H^{10} O^{9}.).

Tannin is, no doubt, a very unstable product both in and out of the plant, and this fact, together with the fact that we have no way of proving just how much the tannin extracts vary from the tannin of the living cell, give a considerable source of error in work of the experiments discussed in this paper.

Tannin is frequently referred to as a waste product, and this may be true in part, but that it is purely a waste product is extremely doubtful. Pfeffer[2] says, "Tannin and glucosides are undoubtedly produced for definite purposes, and are not mere by-products produced under all circumstances."

The families of plants which contain the greatest amount of tannin are Anacardiaceæ, Betulaceæ, Cornaceæ, Cupuliferæ, Ericaceæ, Fagaceæ, Geraniaceæ, Hamamelidaceæ, Lythraceæ, Leguminosæ, Labiatæ, Myrtaceæ, Plumbaginaceæ, Polygonaceæ, Ranunculaceæ,

1. Henry Trimble—The Tannins, Vol. I, p. 18.
2. Pfeffer's Physiology of Plants (Translation by A. J. Ewarts) Vol. I, p. 492 (1900).

Rosaceæ, Rubiaceæ, Salicaceæ, Saxifragaceæ, and Filices. It varies in amount from a very low fraction of a per cent up to 70% in Chinese galls. In the living plant it is dissolved in the cell sap, in the parenchyma or in distinct reservoirs or vessels. It is very abundant in the outer bark, in the heart wood of trees and also in young fruits and in the seed coats and ovary coats of many seeds. In the bark and heart wood it is deposited in various ways; the cell walls of the heart wood become infiltrated and this with possibly some other substances accounts for the characteristic colors of various woods. It is usually very abundant in the outer structures of various nuts. Barley and other grains, when properly stained and sectioned, show a peripheral ring of tannin or tannin compound, just beneath the husk. The amount of tannin in fruits varies throughout the season and in ripening either disappears or becomes insoluble. Gardiner[1] states that tannins are very abundant in the motor tissues of the sensitive plant and similar tissues; and believes that there is some connection between the presence of tannin and the irritability of the tissue. Tannin is also found in certain fungi.

Halsted[2] says that "tannin, as recognized by salts of iron, is abundant in twigs, and in transverse sections is found most common in the rind, and in the inner bark close upon the cambium, and between it and the zone of bast. There is a great difference in the amounts of tannin between the several species. The buds containing more than the other portions, and in immature terminal buds the tannin is quite generally diffused throughout all parts of the soft tissues."

As previously stated, most writers consider that tannin is a waste product; in fact, the number of authors who have made this statement, either with or without cause, mostly without, is so great that it is not worth while to quote or even enumerate them. However, the number who have even intimated that tannin might be of some importance in the economy of the plant is sufficiently small to make some reference possible at this time. Pfeffer[3] says, "Tannins, phloroglucin, and apparently all aromatic substances which accumulate to any extent, are contained in solution in the cell sap, so that their presence does not in-

1. W. Gardiner—"Function of Tannin in Vegetable Cells."
2. Halsted, B. D.—"Reserve Food—Materials in Buds and Surrounding Parts." Mem. Torr. Bot. Club. Vol. II, No. 1.
3. Dr. W. Pfeffer—The Physiology of Plants. 2nd Rev. Ed. Trans. by A. J. Ewarts, p. 492, 1900.

juriously affect the protoplast. Such substances often afford a certain protection against the ravages of animals by reason of their taste and poisonous character, and in all cases where tannins, glucosides, bitter principles, and any other aromatic substances, such as certain pigments, etc., subserve biological functions, they are retained as permanent aplastic products of metabolism." He also says, "Tannin and glucosides are undoubtedly produced for definite purposes, and are not mere by-products produced under all circumstances."

Schultz[1] supporting the views of Sachs and Haberlandt that the leaves of evergreen (at least the Gymnosperms) serve as storage for reserve materials found that the leaves of conifer contain tannin either alone or associated with starch or oil, and considered this tannin as one of the reserve materials.

Tannin is relatively abundant in many fruits, but as the fruit approaches maturity the percentage of tannin decreases. Just how this decrease or change takes place is not well understood but presents an interesting field of work for the bio-chemists and plant pathologists. While some work has been done on this line, it is impossible at this time to draw conclusions. Knowing that tannin is different in different plants and even in different parts of the same plant and at different seasons, we have no reason to conclude that the actions referred to are the same in the fruits of all plants. The same may be said concerning our knowledge of tannin in relation to fermentation which is so closely connected with the above problems.

Rosenstiehl[2] found that when certain yeasts were isolated from cider and sown in apple must, that they were able to reproduce but did not cause fermentation. This he attributed to the presence of the tannin. The yeasts were weaker but regained their normal character when placed under suitable conditions. In another paper the same author says that if the tannin be precipitated with gelatin the fermentation is normal.

Gerber[3] found that in the respiration of soft fruits which contain tannin the volume of carbonic anhydride evolved is less than that of

1. Schultz, E.—Reserve materials, especially Tannin, contained in Evergreen Leaves (See Trimble).

2. Rosenstiehl, A.—Influence of Colouring Matter and Tannin on the Activity of Yeasts.—Woch. f. Bran., 1903, 20 (24), 291-292. Abstract in Jour. of the Soc. of Chem. Ind. 1904, p. 814.

3. Gerber, C.—Function of Tannin in Plants and especially in Fruits. Compt. Rend. (1897) 124, pp. 1106-1109.
Abst. in Amer. Jour. of Phar. Vol. 69: pp. 642-643 (1897).

the oxygen absorbed so long as any tannin remains unaltered. As soon as the tannin has disappeared pectin is produced. He believed that one of the principal functions of tannin in fruits is to prevent pectic transformation and thus check the fermentation of sugars.

Brown and Morris consider the presence of tannin very prejudicial to the action of diastase and that it interferes with the various efforts to ascertain the amount of diastase in vegetable tissues containing tannin. Tannin is not only inhibitory of diastasic action but interferes with the extraction of diastase from the tissues.

Vinson[1] in summarizing his results on the endo-and-ekto-invertase of the date says, "the invertase of the date remains insoluble in all ordinary solvents throughout its green stages, but becomes readily soluble on ripening. The change in the behavior of the invertase towards solvents coincides very closely in point of time with the passage of the tannin into the insoluble form. The tannin in relatively large amounts does not retard the action of the date invertase either in extract or in pulp. Soluble tannin, however, hinders the solution of date invertase in water. * * * Green date cannot be extracted by crushing and macerating the green fruit with glycerol, therefore the invertase is not rendered insoluble by the escape of soluble tannin on crushing the tannin cells. This conclusion is confirmed by the behavior of the invertase in the tannin free portion of the date after the tannin bearing tissues have been completely removed. There is no direct connection between the change in the state of the tannin and that of the invertase."

It is very evident that with our present knowledge of plant physiology, plant pathology, and organic chemistry, that we must look upon the contents of the individual cell as a promising field for research in connection with the problems of susceptibility and resistance on the part of the host to its parasites. As previously stated, tannin was taken first because of its great abundance and wide distribution in nature. Although tannin has not previously been studied in this connection, there are many references in literature which imply that it may have some bearing on the question of immunity. Von Schrenk[2] says, "wherever organic food is stored, the bacteria and fungi are sure to grow with great rapidity if moisture is present. This is one of the rea-

1. Vinson, A. E.—"The Endo-and Ekto-invertase of the Date." Jour. of Amer. Chem. Soc. 30:1005-1020.

2. Schrenk, Hermann Von—"The Decay of Timber and Methods of Preventing It." Bul. 14, Bureau of Plant Industry, U. S. Dept. of Agric. (1902) p. 20.

sons why sapwood rots so much faster than heartwood. The medullary rays and wood elements of the sapwood have been described as full of protoplasm and reserve sugars, starches, oils, etc. After the death of a tree these cells are rapidly invaded by hyphæ, which flourish in the sapwood, and soon bring about its entire dissolution. The heartwood offers no such basis for the beginning of fungus growth. It is further protected by antiseptic bodies, such as various resins, the tannin, etc." In the same publication, after referring to the comparative susceptibility of resistance to decay, and calling attention to the fact that it is not due to hardness, density, specific gravity, or tensile strength, he says, "the reason for their resistance is probably to be sought for in the presence of some substances in the wood which gives it protection against fungi."

Tubeuf & Smith[1] say, "the heartwood resists the influence of certain saprophytic fungi much longer than the sapwood, hence it is preferred as the timber used for railway sleepers. Although in these cases we might describe the heartwood as possessing antiseptic properties, yet this would scarcely be accurate, since it is just this very heartwood which is always first attacked by the wound parasites of trees, and gives them a hold on the tree as parasites."

Dr. R. E. B. McKenney,[2] after studying the blight of the banana in Central America, says, "that the sick plant contains very much less tannin than does the healthy plant."

PLAN OF THE WORK.

The plan of this work as at first outlined consisted in the growing of certain fungi, both parasitic and saprophytic, in media to which tannin had been added, and thus to determine the effect of the tannin upon the growth of the organisms. As the work progressed, new features were suggested and it was found necessary to group the experiments in series. For this purpose a number of media were tried and the following were selected, which will hereafter be referred to by number.

I. Potato Agar.

500 grams peeled potatoes, sliced as thin as possible and cooked in 500 cc. water for one hour at 70° C. Strained through cloth.

1. Tubeuf & Smith—"Diseases of Plants." 1897.
2. From a paper on "The Central American Banana Blight," read at the Boston meeting of the Phyto-Pathological Society, Dec. 1909.

15 grams agar melted in 500 cc. water.

Mix the two, add enough water to make 1000 cc. Add the white of two eggs and boil in the autoclave for two or three hours. Filter through cotton.

II.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Glucose	20 "
	Peptone	10 "
	Dipotassium phosphate	.25 gram
	Magnesium sulphate	.25 "
III.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Glucose	20 "
	Dipotassium phosphate	.25 gram
	Magnesium sulphate	.25 "

(Note.—The use of this medium was discontinued shortly after the introduction of XII.)

IV.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Glucose	10 "
	Peptone	2 "
	Ammonium nitrate	1 "
	Potassium "	.5 gram
	Dipotassium phosphate	.25 "
	Calcium chloride	.01 "
V.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Peptone	10 "
	Liebig's beef extract	5 "
	Ammonium sulphate	1 "
	Dipotassium phosphate	1 "
	Sodium chloride	.5 gram
VI.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Glucose	10 "
	Liebig's beef extract	5 "
	Ammonium sulphate	2 "
	Dipotassium phosphate	1 "

XI. Boil 200 grams of ordinary soup beans in 500 cc. water until plump. This usually requires about 15 minutes. Strain through cloth.

Melt 15 grams agar in 500 cc. water.

Mix and filter through cotton.

(Note.—This medium was recommended to the author by Dr. Thom.)

XII.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Glucose	20 "
	Ammonium nitrate	1 "
	Potassium "	1 "
	Ammonium sulphate	1 "
	Magnesium sulphate	.25 gram
	Dipotassium phosphate	.25 "
	Calcium chloride	.01 "
XIII.	Water	1000 cc.
	Agar	15 grams
	Sugar	10 "
	Dipotassium phosphate	1 "
	Magnesium sulphate	.2 "

XIV. Corn Meal Agar.

15 grams corn meal cooked in 500 cc. water for one hour at 60° C. Strain through cloth.

15 grams agar melted in 500 cc. water.

Mix the two and filter through cotton.

(Note.—Modification of method used in Bureau of Plant Industry of the U. S. Dept. of Agriculture.)

Each of these media were mixed with tannin in the following proportions: .025 (1-40) per cent., .05 (1-20) per cent., .1 (1-10) per cent., .2 (1-5) per cent., .4 (2-5) per cent., .6 (3-5) per cent., .8 (4-5) per cent., 1 per cent, 2 per cent., etc.

Many difficulties, only a few of which can be given, presented themselves. The first and most important was the fact that tannin and peptone form a precipitate which interferred with the hardening of the agar above certain percentages. The importance of this difficulty will be considered later.

The second of these difficulties was due to the tendency of tannin to oxidize and possibly otherwise change its character. Therefore, the

same media with the same percentage of tannin, but of different ages, will give different results due to the fact that the two preparations have undergone different degrees of change. This, no doubt, accounts for most, if not all of the irregularities which appear in the tables.

The preliminary experiments demonstrated that in general the fungi which were parasitic on plants were much more susceptible to the action of tannin than the fungi which were saprophytic on plant material.

They also demonstrated that the amount of inhibition depended not only on the amount of tannin, but also on the medium used. Organisms growing in a medium which was favorable to their growth would tolerate more tannin than when in a medium which was unfavorable.

SERIES I.

In these experiments the organisms were grown on agar media, either in petri dishes, test tubes, or flasks; containing various percentages of tannin.

In the following tables the relative amounts of growth are represented by capital letters, in which A is the maximum; the relative amounts of fruit are represented by small letters. However, each table stands alone; *i. e.,* B in one table does not necessarily mean that the growth is exactly the same as B in another table. The tables are averages from the results of a number of experiments. The media used are represented by the Roman numerals, the amount of tannin by the Arabic fractions, and the period of time in days by the Arabic numbers at the top of each column.

The irregularity of growth in a few tables is probably due to the fact that the medium with its different percentages of tannin had been made at different times and had undergone greater modifications in some plates than in others.

TABLE I.

Three species of *Colletotrichum* were used in nine different media of which five are given in the table. They demonstrated a tendency of tannin to check the growth when used in amounts ranging from .025 to .1 per cent., although the result was irregular in some cases (*i. e., C. lagenarium* (Pass.) Ell. & Hals. on medium No. II). In most cases the growth tends to become equal after a few days. This is especially

TABLE I.

	C. lagenarium								C. gossypii						C. gloeosporioides			
Days	2	3	4	6	7	8	10	13	2	3	4	5	6	11	2	4	5	13
II	..	..	..	..	Ab	..	..	..	B	..	A	..	..	Ab	A	A	..	..
.025	..	..	..	..	Ba	..	..	..	D	..	B	..	..	Ab	A	Ad	..	..
.05	..	..	..	..	Bb	..	..	..	D	..	B	..	..	Ab	A	A	..	..
.1	..	..	..	..	Aa	..	..	..	E	..	B	..	..	Ab	B	A	..	..
.2	..	..	..	..	Aa	..	..	..	E	..	C	..	..	Ab	B	A	..	..
.4	..	..	..	..	Aa	..	..	..	E	..	C	..	..	Ab	B	A	..	..
.6	..	..	..	..	..	..	..	..	E	..	D	..	..	Ab	..	B	..	..
V	..	B	..	B	..	A	..	..	..	C	B	..	..	B	..	..	..	..
.025	..	B	..	B	..	A	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..
.05	..	B	..	B	..	A	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..
.1	..	B	..	B	..	A	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..
.2	..	C	..	B	..	A	..	..	..	..	D	..	..	B	..	..	..	..
.4	..	C	..	B	..	A	..	..	..	..	D	..	..	C	..	..	..	..
.6	..	D	..	C	..	..	..	..	..	..	E	..	..	D	..	..	..	..
.8	..	D	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1	..	..	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
VI	B	B	A	..	..	..	Aa	..	..	A	..	..	Aa	..	A	A	..	d
.025	C	C	B	..	..	..	Aa	..	..	B	..	..	Aa	..	A	A	..	d
.05	D	C	C	..	..	..	Aa	..	..	A	..	..	Aa	..	A	A	..	d
.1	D	C	C	..	..	..	Aa	..	..	B	..	..	Aa	..	A	A	..	d
.2	..	D	D	..	..	..	Dd	..	..	D	..	..	Aa	..	B	A	..	b
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	E	..	..	D	..	C	B	..	..
XI	A	..	A	..	..	a	..	..	..	Bb	..	..	..	..	A	b	Aa	..
.025	B	..	A	..	..	a	..	..	..	Dd	..	..	..	..	B	b	Aa	..
.05	B	..	A	..	..	a	..	..	..	Dd	..	..	..	..	B	d	Aa	..
.1	C	..	A	..	..	a	..	..	..	Dd	..	..	..	..	B	..	A	..
.2	..	..	D	..	..	c	..	..	..	Dd	..	..	..	..	C	..	A	..
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	..
XII	..	A	..	A	..	..	..	..	..	C	..	..	..	Aa	..	..	..	..
.025	..	D	..	A	..	..	..	..	..	C	..	..	..	Aa	..	..	..	..
.05	..	E	..	E	..	..	..	..	..	C	..	..	..	Aa	..	..	..	..
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	..	Cc				
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	..	Cc				
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Dd				

C. gossypii=Glomerella gossypii.

TABLE II.

Days	Gloeo. sp. (from Persea).							Gloeo. sp. (from Vanillae).					G. musarum.				Gloeo. sp. (from Cacao.)										Gloeo. sp. (from grape).								
	2	3	5	6	9	13	14	2	3	4	5	7	2	3	4	5	2	3	4	5	6	7	9	19	24	29	2	3	4	6	7	10	13	14	19
II	A	A	..	Ac	Ac	Ac	..	C	B	Bb	B	Ab	C	Bb	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	B	B	..	Ac	Aa	Aa	..	..	C	Cb	B	Bb	D	Cc	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	C	C	..	A	Aa	Aa	..	..	D	Db	B	Bb	D	Cc	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	D	C	..	C	Bd	Bd	..	..	..	Db	B	Bb	D	Cc	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	D	C	..	C	Bd	Bd	..	..	..	Db	B	Cb	E	Cc	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	D	..	C	C	Bd	..	..	..	Dd	C	Cd	E	De	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	D	..	D	D	Bd	..	..	..	..	D	D	F	Df	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.8	..	..	..	D	D	Cd	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1	..	..	..	C	C	Cd	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
IV	A	A	..	..	..	..	..	D	D	Dc	..	..	D	C	B	Ba	B	A	..	..	..	d	d	..	d	..	..	B	A	..	Ac	..	..	b	..
.025	B	A	b	..	..	..	..	..	E	Eb	..	..	D	C	B	Ba	D	B	..	..	..	d	d	..	e	..	..	D	D	..	Ac	..	..	c	..
.05	B	A	..	..	..	..	..	..	..	Ea	..	..	D	C	B	Ba	D	B	..	d	..	c	c	..	b	..	..	D	D	..	A	..	..	..	..
.1	C	B	..	..	..	..	..	..	..	Ea	..	..	D	C	B	Ba	..	B	..	d	..	c	b	..	a	..	..	D	B	..	B	..	..	..	..
.2	D	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	E	D	Da	..	B	..	..	..	..	c	..	a	..	..	D	D	..	..	..	..	..	..
XI	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	A	A	..	..	c	..	c	c	c	c	C	C	..	Cc	..	..	c	..	..
.025	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	A	..	..	d	..	d	c	c	c	C	C	..	Bd	..	..	d	..	..
.05	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	A	..	..	..	..	..	..	d	d	C	C	..	B	..	..	d	..	..
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	A	..	..	..	..	..	..	e	e	C	C	..	A	..	..	b	..	..
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	A	..	..	b	..	b	b	b	b	..	C	..	A	..	..	a	..	..
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	C	B	..	..	c	..	b	b	b	b	..	..	..	..	..	..	..	..	..
XIV	C	..	B	..	A	..	a	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	B	B	c	..	..	..	..	..	..	a	..	A	..	..	A	A	..	..	a
.025	C	..	A	..	A	..	a	..	..	..	..	..	..	..	..	..	D	C	B	c	..	..	..	..	..	..	c	..	A	..	..	A	A	..	..	b
.05	B	..	A	..	A	..	a	..	..	..	..	..	..	..	..	..	B	A	A	c	..	..	..	..	..	..	c	..	A	..	..	A	A	..	..	b
.1	B	..	A	..	A	..	b	..	..	..	..	..	..	..	..	..	D	A	A	c	..	..	..	..	..	..	a	..	A	..	..	A	A	..	..	b
.2	D	..	D	..	C	..	d	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	E	E	e	..	..	..	..	..	..	..	..	C	..	..	B	A	..	..	c

true on medium No. II which is especially good for most organisms. The fruiting is best on the media without tannin and on the low percentages of tannin. Fruit in most cases is entirely inhibited on .4% tannin.

TABLE II.

Eight species of *Gloeosporiums* of which five are given in the table were used on eleven different media of which four are given in the table. They indicated the tendency of tannin to inhibit growth and the tendency of small amounts of tannin to stimulate fruiting. The results in this case correspond quite well with those given for *Colletotrichum,* but the species of *Gloeosporium* are slightly more sensitive to tannin than the species of *Colletotrichum.* However, there is a slight tendency to fruit on slightly higher percentages of tannin than on the check. (Fig. 1, 2.)

TABLE III.

Glomerella rufomaculans (Berk) Sp. & von Schr., used on three media of which two are given in the table demonstrated the inhibitory action on both growth and fruit in every case. The growth was very slow in starting on the tannin, but on low percentages it finally equalled the growth on the check. The growth was best on medium No. II and poorest on medium No. IV, which indicated the relative values of these media. The best growth ranged from check to .1% tannin dependent on the media and then decreased with the increasing amounts of tannin. There was little or no growth beyond .6%. These experiments were supplemented by chemical analysis of apples from an old orchard which had been protected by insecticides, but not by fungicides. In the early season the fruits are quite high in tannin, the soluble tannin sometimes reaching .4%. As the season advances and the fruit increases in size the percentage of tannin decreases, and as this occurs the fungi increase in number and severity. In no case was the fungi found until the tannin content had dropped below .6%.

G. psidii (G. Del) Sheld from guava was much more resistant to tannin and in fact the growth appeared to be stimulated by tannin. However, in no case did it grow on higher than .4% tannin.

TABLE IV.

A total of twelve species of *Fusarium* were used with eight different media. Three species on three media were selected for the preced-

TABLE III.

	G. rufomaculans.						G. psidii					
Days	2	3	4	5	6		2	3	4	5	7	10
II	A	A	Ab	..	a		E	C	..	C	..	Ca
.025	B	A	Ab	..	a		D	C	..	C	..	C
.05	B	A	Ab	..	a		C	C	..	C	..	A
.1	C	A	Ac	..	b		E	D	..	A	..	A
.2	C	B	Bc	..	c		E	E	..	A	..	A
.4	..	C	Bc	..	c		E	E	..	A	..	A
.6	..	D	Cd	..	d		..	..	..	..	..	..
IV	A	A	a	....			D	B	Aa	..	Aa	..
.025	C	B	b	....			D	B	Ba	..	Aa	..
.05	C	B	b	....			D	C	Ba	..	Aa	..
.1	C	C	c	....			..	D	Be	..	Aa	..
.2	E	D	d	....			..	E	C	..	Ca	..

TABLE IV.

	F. culmorum					F. acuminatum				F. solani		
Days	2	3	4	7		2	3	4	6	2	4	8
II	..	..	..	..		B	..	A	a	A	A	A
.025	..	..	..	..		B	..	A	a	..	A	A
.05	..	..	..	..		B	..	A	a	..	A	A
.1	..	..	..	..		B	..	A	a	..	B	A
.2	..	..	..	..		B	..	A	a	..	D	B
.4	..	..	..	..		B	..	B	d	..	D	B
.6	..	..	..	..		B	..	B	e	..	E	E
IV	A	..	A	Aa		B	..	Ac	b	..	..	..
.025	B	..	B	Ba		B	..	Bb	a	..	..	..
.05	B	..	B	Ba		B	..	Ac	b	..	..	..
.1	C	..	C	Ba		C	..	B	b	..	..	..
.2	D	..	D	C		C	..	A	b	..	..	..
.4	..	..	..	D		..	..	..	..	..	..	..
VI	..	..	..	..		C	..	Cb	..	C	A	A
.025	..	..	..	..		C	..	Bb	..	A	A	A
.05	..	..	..	..		C	..	Bb	..	B	A	A
.1	..	..	..	..		C	..	Bb	..	C	C	A
.2	..	..	..	..		D	..	B	..	..	D	B
.4	..	..	..	..		..	..	C	..	..	..	..

TABLE V.

	C. cana										C. picea.												
	Plate						Tube				Plate								Tube				
Days	2	5	7	8	14	16	3	6	11	14	3	4	5	6	11	14	16	18	3	6	11	12	14
I	..	C	..	B	..	..	B	B	..	..	B	..	..	A	Ab	..	..	..	A	..	..	..	..
.025	..	C	..	B	..	..	D	Cd	..	..	D	..	..	B	Ab	..	..	..	C	..	..	..	D
.05	..	C	..	B	..	..	D	Cc	..	..	D	..	..	B	A	..	..	..	C	..	..	..	D
.1	..	C	..	B	..	..	D	Cd	..	..	D	..	..	B	B	..	..	..	B	..	..	..	..
.2	..	C	..	B	..	..	E	Cd	..	..	D	..	..	C	C	..	..	..	B	..	..	..	C
.4	..	C	..	B	..	..	E	Cc	..	..	D	..	..	C	C	..	..	..	C	..	..	..	D
VI	..	C	A	..	A	d	C	A	A	..	..	A	..	..	..	..	Aa	..	B	Bc	B	b	..
.025	..	C	A	..	A	d	D	C	Ac	..	..	A	..	..	..	..	Aa	..	C	Bb	A	a	..
.05	..	C	A	..	A	d	D	C	Ab	..	..	A	..	..	..	..	Aa	..	D	Cd	A	a	..
.1	..	C	A	..	A	d	D	B	Bb	..	..	A	..	..	..	..	Aa	..	D	Bb	A	b	..
.2	..	C	B	..	A	b	D	D	Bc	..	..	B	..	..	..	..	Aa	..	D	Bb	B	....	
.4	..	D	D	..	D	..	E	E	D	..	..	D	..	..	..	..	Aa	..	E	D	D	....	
XI	....		B	d	....		B	B	..	..	....		B	..	..	..	Bb	..	C	Bd	Bb	....	
.025	....		B	d	....		B	B	..	..	....		B	..	..	..	Bd	..	C	Bd	Aa	....	
.05	....		B	b	....		D	B	..	d	....		C	..	..	..	Bd	..	C	Ba	Aa	....	
.1	....		B	a	....		D	B	..	a	....		C	..	..	..	Aa	..	C	Bb	Ab	....	
.2	....		B	b	....		C	B	..	a	....		B	..	..	..	Ab	..	C	Be	Ad	....	
.4	....		C	c	....		D	D	..	d	....		B	..	..	..	Ad	..	E	C	Cd	....	

TABLE VI.

Corticum alutaceum.

	Agar tubes							Plates.			
Days	3	5	7	12	14	20	28	3	10	17	25
I	E	D	C	..	..	..	C	C	..	Bb	A
.025	D	C	C	..	..	..	B	D	..	D	C
.05	E	D	C	..	..	..	B	D	..	D	D
.1	E	D	C	..	..	..	A	D	..	D	..
.2	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
II	D	..	B	..	A	..	..	C	B	A	Aa
.025	D	..	D	..	Bc	..	..	D	C	A	Ab
.05	E	..	D	..	Bc	..	..	D	C	A	Ab
.1	D	..	D	..	Cc	..	..	D	C	A	Ab
.2	D	..	D	..	Bb	..	..	D	C	A	Ab
.4	D	..	D	..	Bb	..	..	D	C	B	Ab
.6	..	..	D	..	Ab	..	..	E	E	E	Aa
VI	C	D	..	D	..	..	D	..	..	..	..
.025	D	C	..	B	..	..	A	D	C	C	A
.05	E	E	..	C	..	..	B	E	D	Ab	Ab
.1	F	E	..	E	..	..	E	E	E	Da	Da
.2	F	F	..	F	..	..	F	F	F	E	E
.4	F	F	..	F	..	..	F	..	..	..	..
XI	E	D	..	D	..	..	D	..	..	..	..
.025	D	C	..	B	..	..	A	D	C	C	A
.05	E	E	..	C	..	..	B	E	D	Ab	Ab
.1	F	E	..	E	..	..	E	E	E	Da	Da
.2	F	F	..	F	..	..	F	F	F	E	E
.4	F	F	..	F	..	..	F	..	..	..	..

TABLE VIII.

	G. eumorphum															G. smaragdinum										
	Plates												Tubes				Plates						Tubes				
Days	2	3	4	5	6	7	9	11	12	14	20	3	6	10	11	4	5	7	12	14	2	3	5	6	8	9
V	D	..	..	B	..	A	..	..	a	a	..	..	..	..	..	..	..	C	Ac	..	..	C	..	B	Ba	..
.025	D	..	..	D	..	B	..	..	a	a	..	..	..	..	..	D	..	C	Ac	..	..	D	..	C	Aa	..
.05	D	..	..	D	..	B	..	..	a	a	..	..	..	..	..	D	..	B	Ab	..	..	E	..	D	Cc	..
.1	D	..	..	D	..	A	..	..	a	a	..	..	..	..	..	D	..	B	Ab	..	..	E	..	C	Bb	..
.2	D	..	..	C	..	B	..	..	a	a	..	..	..	..	..	D	..	A	Aa	..	..	E	..	C	Ab	..
.4	E	..	..	C	..	B	..	..	a	a	..	..	..	..	..	D	..	C	Ab	..	..	E	..	C	Ab	..
.6	E	..	..	D	..	D	..	..	c	b	..	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	E	..	D	A	..
.8	E	..	..	E	..	D	..	..	c	b	..	..	..	..	..	..	..	..	E	..	..	E	..	E	E	..
1	E	..	..	E	..	E	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	E	..	E	E	..
VI	D	..	C	B	..	A	d	..	..	..	c	D	B	..	A	..	..	B	Ab	..	..	B	B	A	..	..
.025	D	..	D	B	..	A	d	..	..	..	c	D	C	..	B	..	..	B	Aa	..	..	C	B	A	..	..
.05	D	..	D	B	..	A	d	..	..	..	a	D	C	..	Bb	..	..	B	A	..	..	C	B	A	..	..
.1	E	..	E	C	..	A	d	..	..	..	b	D	B	..	Ba	..	..	B	A	..	..	D	B	A	..	..
.2	..	..	E	D	..	A	d	..	..	..	c	D	B	..	Ba	..	..	..	..	..	..	D	C	C	..	..
.4	..	..	E	E	..	B	..	..	..	..	d	D	D	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

TABLE VII.

Lentodium squamulosum.

	Tubes.						Flasks.									
Days	3	5	7	12	20	28	3	7	10	13	14	17	18	21	25	28
I	E	C	B	A	..	..	E	D	D	..	D	..	A	..	A	..
.025	B	A	A	A	..	..	E	E	D	..	D	..	A	..	A	..
.05	B	A	A	A	..	..	E	E	D	..	C	..	B	..	A	..
.1	A	A	A	A	..	..	F	E	E	..	B	..	B	..	A	..
.2	B	B	B	B	..	..	E	E	E	..	E	..	B	..	B	..
.4	..	..	..	..	..	..	G	G	G	..	G	..	C	..	C	..
II	C	B	..	..	..	..	F	D	C	..	C	B	..	B	A	..
.025	B	B	..	..	..	..	E	E	D	..	D	C	..	B	A	..
.05	D	B	..	..	..	..	E	E	D	..	D	C	..	B	B	..
.1	B	A	..	..	..	..	G	E	E	..	D	D	..	B	B	..
.2	E	C	..	..	..	..	E	E	E	..	E	E	..	D	C	..
.4	C	C	..	..	..	..	E	E	E	..	E	E	..	E	C	..
.6	D	C	..	..	..	..	G	G	G	..	G	G	..	F	F	..
IV	..	..	..	..	..	..	..	A	..	..	A	..	..	..	..	A
.025	..	..	..	..	..	..	..	B	..	..	A	..	..	..	..	A
.05	..	..	..	..	..	..	..	C	..	..	A	..	..	..	..	A
.1	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	A	..	..	..	..	A
.2	..	..	..	..	..	..	..	E	..	..	A	..	..	..	..	A
V	..	..	..	..	..	..	..	A	..	..	A	..	..	..	..	A
.025	..	..	..	..	..	..	..	B	..	..	A	..	..	..	..	A
.05	..	..	..	..	..	..	..	B	..	..	A	..	..	..	..	A
.1	..	..	..	..	..	..	..	B	..	..	A	..	..	..	..	A
.2	..	..	..	..	..	..	..	B	..	..	B	..	..	..	..	B
.4	..	..	..	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..	B
.6	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	C	..	..	..	..	C
.8	..	..	..	..	..	..	..	D	..	..	C	..	..	..	..	C
1%	..	..	..	..	..	..	..	F	..	..	D	..	..	..	..	D
VI	D	D	..	B	B	B	C	C	..	B	..	..	B	..	A	..
.025	D	D	..	C	B	A	E	C	..	B	..	..	B	..	A	..
.05	D	D	..	C	B	A	E	D	..	C	..	..	C	..	A	..
.1	E	D	..	D	B	B	F	D	..	C	..	..	C	..	A	..
.2	F	D	..	D	C	B	F	E	..	D	..	..	D	..	B	..
.4	G	G	..	..	..	..	F	F	..	F	..	..	F	..	D	..
XI	C	B	..	..	B	..	..	C	..	..	B	..	A	..	..	..
.025	B	A	..	..	A	..	..	C	..	..	B	..	A	..	..	..
.05	C	A	..	..	A	..	..	C	..	..	B	..	A	..	..	..
.1	B	A	..	..	A	..	..	C	..	..	C	..	B	..	..	..
.2	B	B	..	..	B	..	..	D	..	..	D	..	B	..	..	..
.4	E	E	..	..	E	..	..	E	..	..	E	..	C	..	..	..

ing table as illustrating the facts drawn from the entire series. The tannin was inhibitory so far as growth was concerned, but small percentages usually stimulated fruiting. In this case, as in the preceding, growth was best on medium No. II, and the growth was sometimes better on low percentages of tannin than on the check.

TABLE V.

Several species of *Ceratostomella* were used; three (*C. cana, C. picea,* and *C. cerulea,* Münch) gave good results. It was soon learned that these organisms gave different results when grown in the tubes instead of on plates. In all cases they were much more resistant to tannin than the parasitic species previously referred to and were more resistant in plates than in tubes. It was also observed that small amounts of tannin stimulated the fruiting.

TABLE VI.

Corticum alutaceum (Schrader) Bresadola on four different media in both tubes and plates gave varying results. In some cases there was an inhibition while in others low percentages had slight stimulating effect on both growth and fruit.

TABLE VII.

Lentodium squamulosum Morgan, when grown on nine different media, of which six are given in the table, in both tubes and flasks showed the inhibitory action of tannin although in some cases low percentages (.025 to .1) showed a tendency to stimulate the growth.

This organism was also grown in flasks in which 200 cc. of the medium could be used, thus allowing it to grow a longer time without drying. This experiment was repeated a number of times and the results were extremely variable, but in all cases there was little or no growth on .4 and .6 per cent. tannin. These experiments were then repeated and 20 grams of absorbent cotton added to each flask. This gave a more solid substratum for growth and the cellulose also absorbed considerable quantity of the tannin. In these experiments the organism was able to tolerate more tannin and there was good growth on .4%. It seems probable that the absorption of the tannin by the cellulose had a tendency to check its inhibitory power. (Fig. 3, 4, 5.)

TABLE VIII.

Two species of *Graphium* on nine different media in both plates and tubes demonstrated a very slightly toxic action of the tannin. Low percentages of tannin frequently stimulated the fruiting. These results are illustrated in the table by the two species on the two media.

TABLE IX.

Four species of *Cladosporium* were used on seven different media. Two species on four media are shown in the table. They demonstrate the retarding action of tannin.

TABLE X.

Alternaria solani (E. & M.) Jones & Grout on three media showed slight inhibition in all cases and later a slight stimulation with .05% in one case and with .1% tannin in another. This organism which may be considered semi-saprophytic is decidedly more resistant to tannin than the strictly parasitic species of fungi previously referred to.

Sphaeropsis malorum Pk. on three different media showed inhibition of growth in all cases, but a stimulation of the fruiting in two cases.

Sclerotinia fructigena (Pers.) Schrt. on three different media showed slight inhibition in four cases, and slight stimulation in low percentages in three. With medium No. V the best growths were on .4, .6 and .8% of tannin, showing that this organism can tolerate very high percentages if supplied with suitable food.

TABLE XI.

Diaporthe parasitica Murl. on six different media three of which are given in the table, showed inhibition in two cases, stimulation in three, and no effect in one. Experiments with media No. II and No. XIII readily demonstrate that this organism will tolerate large amounts of tannin if the food supply is suitable for its growth.

TABLE XII.

Peniophora candida (Persoon) Lyman on three different media grown in both tube and flask showed inhibition in all cases and slight stimulation on low percentages in two.

TABLE IX.

Days	C. macrocarpum					C. carpophilum	
	3	4	5	7	10	5	7
I	B	A	A	b	..	A	Bb
.025	..	D	B	b	..	..	D
.05	..	D	B	b	..	..	..
.1	..	D	B	b	..	..	..
.2	..	E	C	b	..	..	..
.4	..	E	D	b	..	..	..
II	D	B	A	..	..	B	Ab
.025	D	C	A	..	..	D	Bb
.05	D	D	B	..	..	E	Bb
.1	D	D	B	..	..	E	Bb
.2	E	D	B	..	..	..	E
.4	F	E	D	..	..	..	E
.6	..	F	E	..	..	..	..
IV	E	C	C	..	C	..	Bc
.025	F	D	B	..	A	..	Dc
.05	F	E	B	..	B	..	Dc
.1	G	F	C	..	B	..	D
.2	..	..	..	..	E	..	..
VI	C	..	A	Ab	..	..	..
.025	C	..	B	Ab	..	..	..
.05	C	..	B	Bb	..	..	..
.1	D	..	D	Ab	..	..	..
.2	D	..	D	Ab	..	..	..
.4	E	..	E	Cb	..	..	..

TABLE XI

Days	Diaporthe parasitica.						
	2	3	4	5	7	9	12
I	C	Cd	B	Ab	..	..	..
.025	..	C	B	Ab	..	..	..
.05	..	C	B	Ab	..	..	..
.1	..	D	C	B	..	..	..
.2	..	D	B	A	..	..	..
.4	..	..	C	B	..	..	..
II	E	E	D	..	Cd	b	a
.025	E	E	D	..	C	b	a
.05	E	C	C	..	C	b	a
.1	..	C	B	..	A	d	b
.2	..	B	B	..	A	d	b
.4	E	A	B	..	A	d	b
.6	..	B	A	..	A	d	c
XIII	..	B	A	..	..	..	..
.025	..	B	A	..	..	..	..
.05	..	B	A	..	..	..	..
.1	..	B	A	..	..	..	..
.2	..	B	A	..	..	..	..

TABLE X.

Days	A. solani.					S. malorum				S. fructigena				
	2	3	4	5		2	3	4	5	2	3	4	5	7
I	..	..	..	..		B	B	..	Ad	C	..	..	A	..
.025	..	..	..	..		C	B	..	Ad	C	..	..	A	..
.05	..	..	..	..		C	B	..	Ad	C	..	..	A	..
.1	..	..	..	..		C	B	..	Ba	B	..	..	A	..
.2	..	..	..	..		D	B	..	Bd	B	..	..	B	..
.4	..	..	..	..		E	C	..	Cd	B	..	..	C	..
II	B	..	B	..		B	..	A	d	D	C	..	..	A
.025	B	..	B	..		C	..	B	d	D	C	..	..	A
.05	B	..	B	..		C	..	B	a	D	C	..	..	A
.1	B	..	B	..		C	..	B	a	B	B	..	..	B
.2	C	..	B	..		D	..	B	a	B	B	..	..	B
.4	C	..	B	..		D	..	B	d	B	B	..	..	B
.6	C	..	B	..		D	..	B	d	D	D	..	..	D
IV	B	..	A	..		B	..	..	Ab	C	..	B	..	..
.025	B	..	B	..		D	..	..	Bb	C	..	B	..	..
.05	B	..	A	..		D	..	..	Bb	C	..	A	..	..
.1	C	..	C	..		D	..	..	Db	D	..	B	..	..
.2	B	..	B	..		..	..	..	D	D	..	D	..	..
VI	C	B	..	B		..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	C	B	..	B		..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	C	B	..	B		..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	C	B	..	Aa		..	..	..	..	..	..	..	..	..

TABLE XIII.

Three species of *Penicillium* on nine different media of which five are given in the table showed inhibition in different degrees. *P. olivaceum* Wehmer showed the maximum power to resist and *P. italicum* Wehmer, the minimum.

TABLE XIV.

This table is to show the media and the percentages of tannin on which each species gave its maximum growth and maximum fruit. In this table the media are indicated by the Roman numerals at the top of the columns; C = check, and it will be seen that in many cases the maximum growth was on the check (*i. e.*, was normal); G = growth; and F = fruit.

With the three species of *Colletotrichums* it will be readily seen that media Nos. II, VI, and XI were the most satisfactory, XII fair, and the others rather poor.

1. *Colletotrichum,* the best growth was most often on check.
2. *Gloesporium,* the best growth was most often on check.
3. *Glomerella,* the best growth was most often on check.
4. *Fusarium,* best growth on check.
5. *Graphium,* best growth on check.
6. *Corticium,* best growth on check.
7. *Cladosporium,* best growth on check.
8. *Necosmospora,* growth and fruit stimulated on .1 and .2%.
9. *Lentodium,* stimulated growth on .025 to .05%.
10. *Ceratostomella,* growth stimulated on .025 to .05%.
    Fruit stimulated on .05 to .1%.

TABLE XV.

This table gives a summarization of the action of tannin for all experiments performed to this time, whether given in the preceding tables or not given. The figures in each column represent the relative number of times in which the organisms reached their maximum (which was also normal) growth and fruit on check and on media containing the various percentages of tannin indicated by the fraction at the head of the columns. It will be readily seen that .025 and .05 percentages of tannin retarded both growth and fruit in the great majority of cases; that as the amount of tannin was increased up to 1% there was rapid and increasing inhibition.

TABLE XII.

	Peniophora candidum							
	Tube					Flask		
Days	3	5	7	12	26	3	10	25
II	E	B	..	B	..	D	A	A
.025	D	C	..	C	..	C	B	B
.05	D	C	..	C	..	B	B	B
.1	C	C	..	A	..	B	B	B
.2	C	C	..	C	..	E	B	B
.4	F	D	..	D	..	F	E	E
.6	..	E	..	E	..	F	E	E
VI	D	C	..	B	B	..	..	..
.025	E	D	..	C	A	..	..	..
.05	D	D	..	C	A	..	..	..
.1	C	D	..	D	C	..	..	..
.2	F	E	..	E	..	..	..	..
.4	F	F	..	F	..	..	..	..
XI	F	D	C	C	..	..	..	..
.025	D	D	B	B	..	..	..	..
.05	D	C	C	B	..	..	..	..
.1	D	C	B	B	..	..	..	..
.2	F	D	D	D	..	..	..	..

TABLE XIII.

	P. olivaceum			P. aureum			P. italicum		
	2	4	7	2	3	4	2	3	4
I	A	..	A	C	B	A	C	B	A
.025	A	..	A	C	C	B	D	C	B
.05	A	..	A	D	D	C	E	D	C
.1	A	..	A	F	E	D	F	E	D
.2	A	..	A	..	D	E	..	..	F
.4	A	..	A	..	..	C	..	..	..
II	A	A	..	E	D	C	D	C	B
.025	A	A	..	F	D	B	D	C	B
.05	A	A	..	F	C	A	C	C	A
.1	A	A	..	F	D	A	C	C	A
.2	A	A	..	F	C	B	D	C	A
.4	A	A	..	F	C	C	D	D	A
.6	A	A	..	..	..	..	..	..	..
V	D	C	..	D	C	B	C	B	A
.025	D	C	..	E	C	B	C	B	A
.05	D	C	..	E	C	B	E	B	A
.1	D	B	..	D	C	B	E	B	A
.2	C	B	..	D	C	B	..	C	B
.4	C	B	..	D	C	B	..	D	C
.6	D	B	..	E	B	A	..	E	D
.8	D	A	..	F	B	A	..	E	D
1%	E	A	..	..	D	C	..	..	..
VI	B	A	..	E	D	C	F	E	..
.025	B	A	..	E	D	C	F	E	..
.05	B	A	..	F	E	B	B	A	..
.1	B	A	..	F	D	A	E	D	..
.2	C	A	..	G	E	A	..	F	..
.4	C	A	..	G	E	D	..	..	..
XI	B	A	..	C	B	A	D	B	A
.025	D	A	..	C	B	A	F	C	B
.05	D	A	..	D	B	A	F	D	B
.1	B	A	..	E	B	A	..	F	E
.2	C	A	..	F	C	A	..	..	..
.4	D	A	..	F	C	B	..	..	..

TABLE XIV.

Media		I	II	III	IV	V	VI	XI	XII	XIII	XIV
Colletotrichum	G	C	C—.4	C—.025	..	C—.4	C—.1	C—.1	C—.025	..	..
lagenarium	F	C—.1	.025—.4	.025—.05	..	..	C—.1	C—.1	C—.05	..	..
G. gossypium	G	..	C—.6	..	C	C—.2	C—.2	C	C—.05	..	C
	F	..	C—.6	..	C—.1	..	C—.2	C	C—.05	..	C
C. gloeosporioides	G	..	C—.4	..	..	..	C—.2	C—.2	..	..	..
	F	..	C	..	..	..	.2	C—.05	..	..	..
Gloeosporium sp.	G	..	C—.05	..	C—.05	..	..	..	C	C—.1	C—.1
from Persea	F	..	.025—.05	..	.05	..	..	..	..	.05—.1	C—.05
Gloeosporium sp.	G	..	C	..	C	..	..	..	..	..	..
from Vanillae	F	..	C—.2	..	.05—.1	..	..	.025—.2	..	..	..
Gloeosporium sp.	G	C—.8	C—.1	C—.1	..	C—.1	C—.1	..	..	..	C—.2
from Mango	F	.1	.6	..	..	C—.6	C—.05	..	..	..	C
Gloeosporium sp.	G	..	..	..	C	C—1	C	C—.2	..	..	.05—.1
from Theobroma	F	..	..	..	.1—.2	1	C—.2	.4	..	..	C & .1
Gloeosporium sp.	G	C	.05—.4	..	C—.1	..	..	..	C—.05	..	..
from Guava	F	C	C	..	C—.2	..	..	..	.05	..	..
Gloeosporium	G	..	C	..	C—.1	..	C—.1	..	..	..	..
musarum	F	..	C	..	C—.2	..	C—.05	..	..	..	..
Gloeosporium sp.	G	C—.2	..	..	C—.05	..	..	.1—.2	C	..	C—.1
from grape	F	C—.025	..	..	C	..	..	.1	..	..	C
Glomerella	G	..	C—.1	..	C	..	C—.05	..	..	..	..
rufomaculans	F	..	C—.05	..	C	..	C—.025	..	..	..	..
Necosmospora	G	..	.025—.1	..	.1	.1—.6	.1—.2	..	..	..	..
vasinfecta (cotton)	F	..	.2	..	.05	.8—1	.1	..	..	..	..
N. vasinfecta	G	.1—.4	.2	C—.05	.1	C—.6	C	C—.1	..	..	..
(watermelon) var. nivea	F	.05	.2	C	C—.2	.4—.6	.05	C—.4	..	..	..
Fusarium culmorum	G	..	..	C	C	..	..	..	..	..	..
	F	..	..	..	C—.1	..	..	..	..	..	..
F. solani	G	..	C—.1	..	..	..	C—.1	..	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
F. acuminatum	G	C	C—.2	..	C, .05, .2	..	.025—.4	..	C—.1	..	..
	F	C—.2	C—.2	..	.025	..	C—.1	..	C	..	..
Fusarium sp.	G	.025—.4	.025—.1	..	.1—.2	..	C—.4	..	C—.2	..	..
from rotten tomato	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

TABLE XIV.—(*Continued.*)

Media		I	II	III	IV	V	VI	XI	XII	XIII	XIV
Fusarium sp.	G	..	C .2	..	..	.8	..	..	C—.025	..	..
stem rot of tomato	F	..	C—.1	..	..	.2- .8	..	..	..	..	..
Fusarium sp.	G	..	C	C—.05	C—.2	..	..	..	..	..	..
	F	..	..	C—.05	.05	..	..	..	..	..	..
Fusarium sp.	G	..	C—.1	..	.05—.1	..	C	..	..	..	..
	F	..	.4	..	..	..	..	..	..	..	..
Fusarium sp.	G	..	C—.1	..	C—.05	..	..	..	C—.05	..	..
from apple	F	..	C—.05	..	.05—.1	..	..	..	.025—.05	..	..
Graphium eumorphum	G	C—.1	C—.2	.05—.1	..	C—.1	C— .2	C—.4	..	..	..
(plates)	F	..	.2	.1	..	C—.4	.05	..	..	..	..
G. eumorphum	G	.2	C—.2	..	..	C	C—.8	.025	C—.025	..	.05—.1
(tubes)	F	..	..	..	..	C—.1	.1—.2	.025	C—.05	..	.05—.1
G. smaragdinum (plates)	G	..	C—.4	..	..	C—.4	C—.1	C—.05	..	..	C
	F	..	C—.4	..	..	.2	.025	..	..	..	C—.05
G. smaragdinum (tubes)	G	C—.2	C—.2	..	C	C, .2—.6	C—.1	.025—.1	..	..	..
	F	.025	.1	..	C & .1	C & .025	..	.025	..	..	..
Leutodium squamulosum	G	C—.1	.1	.1	..	..	.025—.05	.025—.1	..	..	..
(tubes)	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Leutodium squamulosum	G	C—.1	C—.025	..	C—.2	C—.1	C—.1	C—.05	C	.025—.05	.025—.05
(plates)	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Corticium alutaceum	G	.1	C & .6	..	C	..	C	.025	..	..	..
(tubes)	F	..	.2—.6	..	.025	..	..	..	..	..	..
Corticium alutaceum	G	C	C—.6	..	C—.05	..	C—.05	.025—.05	..	..	..
(flasks)	F	C	C & .6	..	.025	..	C	.1	..	..	..
Ceratostomella cana	G	C—.4	..	..	C	..	C—.2	C—.2	..	..	..
(plates)	F	..	..	..	..	..	C—.2	.1	..	..	..
Ceratostomella cana	G	C	..	..	C—.025	..	C—.05	C—.2	.05	..	C—.05
(tubes)	F	.05, .4	..	..	..	..	.05—.1	.05, .1	..	..	C—.05
Ceratostomella cerulea	G	.025—.2	C	C—.1	..	..	..	.05—.4	..	..	..
(plates)	F	..	..	C	..	..	..	.2	..	..	..
Ceratostomella cerulea	G	C—.2	C—.6	..	C—.2	..	..	C—.2	.05	..	.1
(tubes)	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	.1
Ceratostomella picea	G	C—.05	C—.6	..	.1	C—.6	C—.4	.1—.4	..	..	C—.2
(plates)	F	C—.025	..	..	.1	.6—1	C—.4	.1	..	..	.025—.1
Ceratostomella picea	G	.2	C— .025	..	C—.05	.2—1	.025—.1	.025—.2	..	..	..
(tubes)	F	..	.05	..	..	1	.025—.05	.025—.1	..	..	..

TABLE XIV.—(*Continued.*)

Media		I	II	III	IV	V	VI	XI	XII	XIII	XIV
Cladosporium macrocarpum	G	C	C—.025	..	.025	..	C—.2	..	..	..	..
	F	C– .4	..	..	..	..	C—.4	..	..	..	..
Cladosporium carpophilum	G	C	C	C	C	C	..	..	..	..	..
	F	C	C—.1	C	C—.05	C	..	..	..	..	..
Fusiccoccum viticolum	G	..	..	..	..	..	..	..	C– .1	C—.1	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	C—.025	.1	..
Pythiacystis citrophthora	G	.2	C—.6	C—.1	.1—.2	..	C—.1	.025—.2	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Rhizoctonia sp. from carnation	G	..	C—.1	..	C—.05	..	.05	..	.05	..	.025—.2
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Phoma sp. from rotten grape	G	C—.4	C—.1	..	C—.1	C—.1	..	C—.1	..	..	..
	F	C	C	..	C	C—.1	..	C—.1	..	..	..
Alternaria solani	G	..	C—.6	..	C & .05	..	.1	..	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	.1	..	..	..	..
Sphaeropsis malorum	G	C—.05	C	..	C	..	..	..	..	..	..
	F	.1	.05—.2	..	C—.1	..	C– .2	.1	..	..	..
Sclerotinia fructigena	G	C—.1	C—.05	C—.05	.05	.4—.8	..	..	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Guignardia bidwelli	G	C– .05	..	..	..	..	C—.05	.05	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Septoria verbasicola	G	..	.025—.6	..	..	..	.1—.2	..	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Diaporthe parasitica	G	C—.2	.1—.6	..	.1	..	C—.4	..	..	C—.2	.025—.05
	F	..	C—.05	..	..	..	..	..	..	..	..
Pheniophora candida (tubes)	G	.	.1	..	..	..	.025—.05	.025—.1	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Pheniophora candida (flasks)	G	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Penicillium olivaceum	G	C—.4	C—.6	..	..	.8—1	C—.4	C—.4	..	..	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Penicillium aureum	G	C	.05—.1	.1	.025	.6—.8	.1—.2	C—.2	C .025	.	..
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Penicillium italicum	G	C	.05—.4	C—.05	.025—.1	C—.1	.05	C	C	..	C—.05
	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Necosmospora vasinfecta, Guignardia bidwellii, Septoria verbasicola, Ascochyta pisi, Cephalothecium roseum, and some undetermined species of *Phyllosticta, Rhizoctonia,* and *Phoma* were also used. The results were practically the same as given in the tables. A great many bacteria were also used and in all cases were inhibited by .1% of tannin, frequently by .05%, and sometimes by .025%. (Fig. 6, 7.)

SUMMARY FOR SERIES I.

A study of the preceding tables will show that

1. Tannin has a tendency to retard or inhibit the growth of fungi.
2. The parasitic forms are more sensitive to the action of tannin than the saprophytic forms.
3. The organisms will tolerate more tannin when grown in medium suitable to their growth than when grown in an unsuitable medium.
4. In some cases the growth was at first retarded by certain percentages of tannin and later became as good or even more luxuriant than on the medium without tannin.
5. Growth was sometimes stimulated by low percentages of tannin. This was more likely to be true with the saprophytes than with the parasites.
6. *Pennicillium olivaceum* would tolerate more tannin than any other species used.
7. The majority of the species showed greatest retardation from .1% to .4% tannin.
8. The fruiting was frequently best on the low percentages of tannin.

SERIES II.

The work next suggested the use of the same medium prepared with and without agar. The results of these experiments indicate that there is a very little difference. In some cases the growth in agar media being slightly the better, while in other cases the liquid media gives slightly better results.

A series of experiments were also conducted using fresh extract of oak bark. The results indicate that the commercial tannin is slightly more toxic than the oak tannin. The same was true with pear bark extract when used with *Glomerella rufomaculans.*

TABLE XV

Percentage of tannin		C	.025	.05	.1	.2	.4	.6	.8	1%
Colletotrichums	G	17	12	10	10	8	5	1	..	..
	F	12	11	10	8	5	2	1	..	..
Gloeosporiums	G	29	21	23	19	11	5	2	2	2
	F	16	11	15	11	8	2	2	0	1
Glomerella	G	3	2	2	1	..	..	..	..	..
refomaculans	F	3	2	1	..	..	..	..	..	..
Necosmospora	G	4	4	2	8	5	3	2	..	..
vasinfecta	F	3	2	5	3	4	1	1	1	1
Fusariums	G	21	19	21	15	11	5	1	1	..
	F	9	10	11	7	5	3	2	1	..
Graphiums	G	19	16	16	16	10	4	1	..	..
	F	7	10	7	8	5	2	..	..	..
Lenzites	G	8	11	9	8	1	..	..	..	..
squamulosum	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Corticium	G	7	5	4	2	1	1	2	..	..
olitaceum	F	3	2	0	1	1	1	2	..	..
Ceratostomellas	G	22	23	24	20	18	8	4	1	1
	F	5	7	9	9	3	2	1	1	2
Cladosporiums	G	11	3	1	1	1	..	..	..	..
	F	9	6	4	3	2	2	..	..	..
Phyllosticta sp.	G	1	1	1	..	..	..	1	..	..
	F	1	1	..	..	..	..	..	..	..
Fusicoccum	G	2	1	2	2	..	..	..	..	..
viticolum	F	1	1	..	1	..	..	..	..	..
Pythiacystes	G	3	3	2	4	0	1	..	..	..
	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Rhizoctonia	G	2	3	5	2	1	..	..	..	..
	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Phoma sp.	G	5	3	3	4	1	1	1	1	1
from rotten grape	F	5	2	2	2	..	..	..	..	..
Alternaria solani	G	2	1	2	2	1	1	1	..	..
	F	..	..	..	1	..	..	..	..	..
Sphaeropsis	G	3	1	1	..	..	..	..	..	..
malorum	F	2	2	3	5	2	..	..	..	..
Sclerotinia	G	3	3	4	1	0	1	1	1	..
fructigena	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Guignardia	G	2	2	3	..	..	..	..	..	..
bidwelli	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Septoria	G	..	1	1	2	2	1	1	..	..
verbasicola	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Ascochyta pisi	G	1	..	..	..	..	..	..	..	..
	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Diaporthe	G	3	4	4	4	4	2	1	..	..
parasitica	F	1	1	1	..	..	..	..	..	..
Pheniophora sp.	G	1	2	2	2	..	..	..	..	..
	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Penicillium	G	15	11	12	11	7	5	2	2	1
	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
Total	G	184	152	154	144	82	43	21	8	5
	F	77	68	68	59	35	15	9	3	4

The question as to whether the toxic action was due to the tannin or to the acid radicle next presented itself. In order to determine this sodium tannate was substituted for tannin in medium II. The results indicate that the tannin is slightly more toxic than the sodium tannate.

A medium made to contain sugar alone in varying percentages and another with same amounts of sugar plus the tannin indicated that the tannin was decidedly toxic.

It was also thought that possibly the precipitate formed by the proteid and tannin might merely result in removing the proteid food and thus check the growth of the fungus, but other experiments proved the tannin to be toxic in media without proteid and in distilled water.

SERIES III.

It was next found desirable to conduct a series of experiments in which an actual count of spores could be made. Such a series of experiments would check Series No. I and give far more accurate results. For this purpose it was determined to make a series of experiments using the Van Tiegham cells. In the tables in which these results are given the germination is represented in percentages. The growth and spore formation are represented by letters, but each column is independent, *i. e.*, the column for growth at the end of 72 hours does not indicate increase over 48 hours, but the relative growth on the different percentages of tannin at that time. Gm = germination, Gw = growth, and S = spores.

In all cases the experiments were run for several days, but the results are not given beyond the point from which they became constant. In all cases drawings were made from day to day. Such drawings were then selected as demonstrated *all* the points without duplicating more than was absolutely necessary.

TABLE XVI.

Several species of *Glocosporium, Glomerella* and *Colletotrichum,* were tested on six different media. The results show very clearly the inhibiting action of tannin on both germination and growth but also shows that in many cases the low percentages of tannin stimulates spore formation. In all cases the germination and growth starts best on the check and on the low percentages. In all cases a certain point is reached beyond which the spores will not germinate. In no case did germination occur beyond .6% tannin. In media containing the higher

TABLE XVI.

	G. psidii (from Guava)					Gloeo. sp. (from Mango)							Gloeo. sp.(fr. Cacao)					Gloeo. sp. (from Persea)						G. musarum.										G. rufomaculans drop culture								block culture			C. lagenarium					C. gossypium			
Hours	24		48		72	24		48		72			24		48			48	72		96		120	24		48		72		94		24		48		72		120		24		48	24		48	10		72		96
	Gm	Gw	Gm	Gw	S	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S	Gm	Gw	Gm	Gw	S	Gm	Gm	Gm	Gw	S	S	Gm	Gw	Gm	Gw	Gw	S	Gw	S	Gm	Gw	Gm	Gw	Gw	S	Gw	S	Gm	Gw	Gm	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gm	Gw	Gm
H_20	100% A		..	A	..	100	..	..	..	..	..	..	100	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	..	..																											
.025	100% B		..	A	..	..	..	100	..	..	..	..	100	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..			100																											
.05	..	..	100	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..																													
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..																													
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..																													
II	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	B					A	A	100	A					B		100	A	B	100	B						19
.025	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	A					A	A	100	A					A		100	A	B	100	A						
.05	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	B					B	B	100	B					A		100	B	A	100	A						
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	C			B		C	B	100	B					A		100	B	A	100	B						
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	D			A		D	B	100	C					B		?	C	B	100	C	..					
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	D			B		D	B	100	D					C		?	D	C	83	D	100					
.6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	D			B		D	B	77	E					C		.			31	D	100					
.8	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	63	E			..		D		.												48						
IV	..		..		..	.		.		.		..	100	A			B	.	100		B		A	100	B		B		C				100	A	B		B						43		100						
.025	..	..	..	..	..	.		.		.		..	100	A			A	.	100		B		B	100	B		A		B				100	A	B		B						100		100						
.05	..	..	..	..	..	.		.		.		..	100	B			B	.	100		B		A	100	A		B		A				100	B			A						43		100						
.1	..	..	..	..	..	.		.		.		..	100	C			C	.	100		A	..	B	100	A		B						100	C			A						65		100						
.2	..	..	..	..	..	.		.		.		..	100	D				.	..		..												100	C			B												
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	40	E				.	..		..												100	C			C												
VI	..	..	..	..	..	100	A	.		.	A	C	..				.	.	100	.	A	A		100	A				A																						
.025	..	..	..	..	..	100	A	.		.	A	B					.	.	100	.	A	A		100	B																									
.05	..	..	..	..	..	100	B	..	..	.	B	A					.	..	100	..	B	..		72	C																									
.1	.	..	..	..	..	62	B	100	.	.	C	A					..	..	100	..	C			55	D																									
.2	..	..	..	..	..	..	..	100	..	..	C	B					..	.	..	100	D																													
.4	..	..	..	..	..	..	..	100	..	..	D	..					..	.	..	..																														
.6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	61	E						..	.	..	..	..																													
XII	100	A	..	A	A	.	.	.		.							..	26	100	.		A																												
.025	100	A	..	A	..	.	.	.		.							..	.	..	.		.																												
.05	78	B	100	B	..	.	.	.		.							..	.	.	.		.																												
.1	51	C	100	C	..	.	.	.		.							..	.	.	.		.																												
XIV	..	..	..	..	..	.	.	.		.		..	100	A		A	B	.	..																														
.025	..	..	..	..	..	.	..	.		.		..	100	A		A	A	.	.																														
.05	..	..	..	..	..	.	..	.		.		..	60	B	100	A	A	.	.																														
.1	.	..	..	..	..	.	.	.		.		..	45	C	100	B	B	.	.																														
.2	.	.	.	.	.	.	.	.		.		.	.		100	C	..	.	.																														

(Pages 31 and 32)

percentages of tannin the percentages of germination are not only reduced, but the time for germination is increased.

The action of tannin in distilled water is well illustrated by *Glomerella psidii* from Guava (Figs. 8, a, b, c) in which there is a decided inhibitory action, while the *G. gossypii*, (Southworth,) Edg. (Figs. 9, a, b, c, d) there was an increased growth with .025 and .05 per cent. tannin. The amount of inhibition varied with the different species. *Glomerella rufomaculans* (Berk.) Sp. & von Schr., was the most resistant, giving complete germination on .1% tannin and maximum growth on .05%.

Glomerella rufomaculans on No. II, which is an excellent medium, (Figs. 10, a, b, c, d) shows a complete germination up to .4 in 24 hours, as compared with complete germination up to .1 in distilled water in 72 hours. At the end of 24 hours the best growth was on check and .025 and on check to .1 in 72 hours. On medium No. IV the germination was complete up to .4% in 24 hours, and growth best on check and .025% but at the end of 72 hours the growth was best on .05 and .1%.

Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell. & Hals., on medium No. II (Figs. 11, a, b, c, d, e, f) shows the stimulating effect of .025 and .05 per cent. tannin and a decrease in growth with higher percentages. On medium No. IV the .025% of tannin was stimulating.

Gloeosporium sp. from Cacao on medium No. IV (Figs. 12, a, b, c, d, e) shows germination on check and .025% to be the same at the end of 24 hours with rapid inhibition on the higher percentages of tannin. At the end of 48 hours spores had been formed on check to .1 percentage, but was best on .025% tannin. Medium No. XIV was not so good for this organism, and the inhibition by the use of tannin was greater (Figs. 13, a, b, c, d.).

Glomerella psidii from Guava on medium No. XII was unaffected by .025 per cent. tannin, but inhibited by the higher percentages. (Figs. 14, a, b, c, d, e.)

G. musarium Cooke, on medium No. 11 gave complete germination on .6% tannin in 24 hours, which was .2% higher tannin than any other species in the table, or on any other medium. However, the best growth at the end of 94 hours was on check and .025%. On two other media it was more susceptible to the action of tannin and on medium No. VI was less resistant than the *Glocosporiums* from Mango and Persea.

TABLE XVII.

	F. culmorum		F. sp. (from apple)								F. sp. (from tomato)				F. oxysporum					F. sp. (from banana)						
Days	24		24		48		72			96	24		48		24		48		72	24		48		72		
	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S	S	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S	S	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S
H_2O	47	..	100	B	..	C	..	..	..	..	100	..	..	..	46	..	100	B	B	..	100	..	..	..	..	..	..
.025	..	..	100	A	..	A	..	..	..	..	100	..	..	..	100	..	100	A	A	..	100	..	..	..	..	..	..
.05	..	..	52	B	100	B	..	..	..	..	..	..	..	..	55	..	100	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	..	..	43	C	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	37	B	..	100	..	..	..	..	..	..	..
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	28	B	..	100	..	..	..	..	..	..	..
II	..	..	100	A	..	..	..	A	C	..	100	A	..	A	100	A	..	A	A	..	100	A	A	..	..	A	A
.025	..	..	100	A	..	..	..	A	B	..	100	B	..	B	100	A	..	A	A	..	100	A	B	A	..	A	B
.05	..	..	100	A	..	..	..	A	A	..	100	B	..	B	100	A	..	A	A	..	100	A	C	..	..	A	B
.1	..	..	100	A	..	..	..	A	B	..	100	B	..	B	100	B	..	B	B	..	100	B	C	..	..	B	B
.2	..	..	100	A	..	..	..	A	..	..	100	B	..	A	100	B	..	B	B	..	100	B	C	..	..	C	C
.4	..	..	100	B	..	..	..	A	..	..	100	B	..	..	100	B	..	B	B	..	100	B	D	..	..	D	..
.6	..	..	100	B	..	..	..	A	..	..	100	B	..	A	100	C	..	B	..	..	..	..	..	..	100	E	..
.8	..	..	100	B	..	..	..	A	..	..	..	..	..	..	33	D	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..
IV	100	A	100	A	..	..	..	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	100	B	100	A	..	..	..	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	100	C	100	A	..	..	..	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	100	D	100	A	..	..	..	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	..	..	100	A	..	..	..	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	..	100	A	..	..	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	..	100	B	..	..	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
XII	100	..	100	C	..	B	..	..	B	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	..	..	100	B	..	A	..	..	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	..	..	100	A	..	A	..	..	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	..	..	81	D	100	A	..	..	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	..	..	78	E	100	B	..	..	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	..	..	..	100	C	..	..	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	..	..	..	..	..	100	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

TABLE XVII.

Five species of *Fusarium* were used on four different media and demonstrated the same laws as in the preceding tables of this series, but also showed that the *Fusariums* are more resistant than the *Gloeosporiums, Colletotrichums* or *Glomerellas*. The spores germinate more readily in higher percentages of tannin, and the maximum growth occurs on higher percentages than the spores of the preceding species. Again we find the low percentage of tannin stimulating the growth in one case (Fig. 15, a, b, c, d) and retarding in another (Fig. 16, a, b.)

The growth of *Fusarium oxysporum* Schlecht, from potato on medium No. II was not checked with less than .1 percentage of tannin (Fig. 17, a, b, c, d), while an undetermined species from tomato was checked with .025%.

Fusarium culmorum (Smith) Sacc. on medium No. IV showed a retardation of growth with .025% (Fig. 18, a, b, c, d), while *Fusarium sp.* from apple on the same medium was not checked in its growth with less than .1 per cent. tannin (Fig. 19, a, b, c).

An undetermined species of *Fusarium* from the apple on medium No. II gave complete germination on .8% tannin in 24 hours, maximum growth from check to .2% in 24 hours and maximum growth on check to .8% in 72 hours. The maximum spore formation was on .05% tannin. On medium No. IV this species was almost or quite as resistant as on medium No. II, but was much less resistant on medium No. XII. This was the most resistant species of *Fusarium* used.

TABLE XVIII.

Cladosporium macrocarpum Preuss. would not germinate in water with more than .025% tannin. On media Nos. II and VI it was more resistant than the *Fusarium*. On medium No. II, .025% tannin had no effect in 24 hours (Fig. 20, a, b, c, d, e f) but on medium No. VI the retarding effect of the tannin was shown with .025% (Fig. 21, a, b, c, d). On medium No. II the germination was complete from check to .6% in 24 hours, and in 48 hours was complete on .8 and 1%. The growth was best on check and .025%. The spore formation started on check in 96 hours and at the end of 11 days was on .6%, but best on check, .025 and .05 percentages of tannin. On medium No. VI this species was far less resistant than on medium No. II.

TABLE XVIII.

Cladosporium macrocarpum.

Time	24 hrs.		48 hrs.		72 hrs.	96 hrs.		120 hrs.	11 days
	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S	S	S
H_2O	100%	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	38%	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	0	..	..	..	..	..	..	..	..
II	100%	A	..	A	..	..	A	A	A
.025	100%	A	..	B	..	..	..	A	A
.05	100%	B	..	B	..	..	..	A	A
.1	100%	B	..	B	..	..	..	..	B
.2	100%	C	..	C	..	..	..	..	B
.4	100%	C	..	D	..	..	..	..	B
.6	100%	D	..	D	..	..	..	..	B
.8	..	..	100%	E	..	..	..	..	..
1	..	..	100%	E	..	..	..	..	..
VI	100%	A	..	..	..	A	..	..	..
.025	100%	B	..	..	..	B	..	..	..
.05	100%	B	..	..	..	B	..	..	..
.1	100%	C	..	..	..	B	..	..	..
.2	..	..	..	..	65%	C	..	..	..

TABLE XIX.

Hrs.	P. olivaceum 24 Gm	24 Gw	24 Br	48 Gm	48 Gw	48 Br	48 S	72 Gw	72 S	96 S	120 S	P. aureum 24 Gm	24 Gw	24 Br	48 Gm	48 Gw	48 Br	48 S	72 Gm	72 Gw	72 S	96 Gm	96 S	P. italicum. 24 Gm	24 Gw	48 Gm	48 Gw	48 S	72 Gm	72 Gw	72 S	96 Gm
H_2O	58	B	..	..	B	..	..	B	B	..	..	75	A	..	100	A	..	..	..	..	..	..	B	87	..	100	..	..	100	..	..	..
.025	100	A	..	..	A	A	..	A	A	..	..	41	A	..	100	A	..	..	..	..	A	..	A	..	..	67	..	..	100	..	..	..
.05	100	B	..	..	B	A	..	A	A	..	..	67	A	..	100	A	..	..	..	..	B	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	100	B	..	..	B	A	B	A	A	..	..	..	..	..	100	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	100	B	..	..	B	A	B	A	A	..	..	..	..	..	43	B	..	..	100	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	100	B	..	..	B	A	B	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	71	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6–.8	100	B	..	..	B	A	B	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1, 2	100	B	..	..	C	A	B	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
4–28	100	B	..	..	C	A	B	A	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
32	100	C	..	..	D	..	B	A	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
I	100	B	B	..	A	..	A	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	100	A	A	..	A	..	C	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	100	A	B	..	B	..	C	B	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	100	B	C	..	B	..	C	B	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2–.8	100	C	C	..	B	..	C	B	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1, 2	100	D	C	..	B	..	C	B	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
4	100	D	D	..	B	..	C	B	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
8–12	100	D	D	..	B	..	..	B	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
16	100	D	D	..	C	..	..	C	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
20	100	E	..	..	C	..	..	C	..	E	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24–28	100	E	..	..	D	..	..	D	..	..	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
32	100	E	..	..	E	..	..	E	..	..	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
II	100	A	..	..	A	..	..	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	100	A	..	..	A	..	A	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	100	A	..	..	A	..	B	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1–1	100	A	..	..	A	..	B	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
2	100	B	..	..	B	..	C	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
4	100	C	..	..	B	..	C	A	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
8	100	C	..	..	B	..	..	B	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
12	100	D	..	..	B	..	..	B	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
16	57	D	..	..	B	..	..	B	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
20	41	D	..	..	B	..	..	B	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24	46	D	..	..	D	..	..	B	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
28	60	D	..	..	D	..	..	B	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
32	51	D	..	..	E	..	..	B	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
IV	100	A	..	..	A	A	C	..	..	..	..	100	C	B	..	C	B	..	..	..	A	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	100	B	..	..	A	A	B	..	..	..	..	100	B	A	..	B	B	..	..	..	A	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05	100	B	..	..	A	A	B	..	..	..	..	100	A	B	..	A	A	..	..	..	B	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	100	B	..	..	A	A	B	..	..	..	..	100	D	B	..	B	B	..	..	..	B	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	100	B	..	..	A	A	A	..	..	..	..	..	..	..	100	D	..	..	..	..	C	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	100	B	..	..	A	A	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	68	..	D	..	E	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	100	C	..	..	B	B	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	10	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.8	100	D	..	..	B	B	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1	100	E	..	..	B	B	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
2	100	F	..	..	B	B	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
4	100	G	..	..	C	C	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
8–12	100	H	..	..	C	C	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
16	61	H	..	..	D	D	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
20	41	H	..	..	D	D	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24	36	H	..	..	D	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
28	33	H	..	..	D	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
32	38	H	..	..	D	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
V	100	D	..	B	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.025	100	C	..	A	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.05–.8	100	B	..	A	..	B	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1–2	100	A	..	A	..	A	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
4–12	100	..	..	C	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
16	100	..	..	C	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
20	43	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24	38	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
28	34	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
32	36	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
VI	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	B	B	100	B	B	A	..	B	A	..	..	100	A	..	A	B	..	..	B	..
.025	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	82	C	..	100	B	B	A	..	B	A	..	..	100	B	..	B	B	..	..	A	..
.05	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	A	A	100	A	A	B	..	A	A	..	..	100	B	..	B	A	..	..	A	..
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	93	D	..	100	A	A	C	..	A	A	..	..	100	B	..	B	..	..	..	..	..
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	35	E	..	100	C	C	..	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	C	C	..	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	D	..	..	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.8	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
XII	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	A	..	..	B	B	..	..	A	B	..	A	100	..	100	A	A	100	A	A	100
.025	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	B	..	..	A	A	..	..	A	A	..	B	71	..	71	B	..	100	B	B	100
.05	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	C	..	..	B	B	..	..	B	..	..	C	..	..	..	..	..	..	..	..	100
.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	90	D	..	100	C	..	..	..	C	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	71	E	..	100	D	..	..	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	37	E	..	100	E	..	..	..	E	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	24	E	..	100	E	..	..	..	E	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.8	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	F	..	..	..	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	100	G	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

(Pages 37 and 38)

TABLE XIX.

The *Penicilliums* were used on seven media which indicated the inhibitory action of tannin on germination, growth and fruiting. The *P. olivaceum* was most resistant and *P. italicum* least resistant. *P. olivaceum* grown with distilled water, appeared to be stimulated by the tannin ranging from .025% to 2% and in some cases there was very little reduction in growth until 32% was reached. This is in sharp contrast to the inhibitory effect on other fungi used in the preceding tables (Fig. 22, a, b, c, d, e). With medium No. I the best results were on check. With medium No. II there was very little variation in the growth until 2% tannin was reached, but from that point there was a very pronounced retardation of growth (Fig. 23, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k). With medium No. IV the best growth was on check to .4 and best spore formation on .2 and .4 percentages in 48 hours. With medium No. V there was a gradual stimulation from the check to 2% tannin, and in the higher percentages a pronounced decrease in growth; the growth also having a tendency to become irregular (Fig. 24, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j).

P. aureum Van Tiegh., in distilled water plus tannin showed a decided reduction in power of germination. The best growth was on check to .1%, and best spore formation on .025% tannin. On medium No. IV the germination was better, the maximum growth on .05% and finally the best spore formation on .1% tannin. (Fig. 25, a, b, c, d, e, f). On media Nos. VI and XII the germination was better than on IV, and the growth best on .05 and .025%.

P. italicum Wehmer was by far the least resistant of the three species.

TABLE XX.

Aspergillus sp. have complete germination in water and tannin from check to 32% in 72 hours. There was a slight increase in growth up to .6%, but in the higher percentages there was a gradual reduction in the growth (Fig. 26, a, b, c, d, e, f, g).

Germination was also complete for media Nos. I and II. On medium No. I there was a stimulation up to .2% while on No. II there was a stimulation of growth up to .4% and sometimes to .8%, with a gradual reduction of growth for the higher percentages (Fig. 27, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j).

Germination and growth were both very much retarded on medium No. IV. There was no germination on 12% tannin.

There was also a retardation of germination and growth on medium No. V with maximum on .2 to 1%, and no germination beyond 24%.

In water and tannin the spore formation was slower than on media Nos. I and II.

TABLE XXI.

Three rusts and one smut were used on five different media and all demonstrated the toxic properties of the tannin. The smut was the only one in which there was complete germination of the spores. The tannin had a tendency to check the germination in all cases except two, the carnation rust on medium No. V, and Solidago rust on medium No. IV, in which there was a stimulation with .025% tannin. The character of the growth is illustrated by Figs. 28, a, b, c; 29, a, b, c; 30, a, b, c; 31, a, b; and 32, a, b.

TABLE XXII.

A condensed table of the preceding indicates that tannin retards germination and growth. In all cases with the exception of two, (*Aspergillus* sp. on medium No. I and *P. olivaceum* in water) there was complete germination on the check. The *Gloeosporiums* and *Colletotrichums* would tolerate from .2 to .4% less tannin than the *Fusariums*, the *Penicilliums* more than the *Fusariums*, and the *Aspergillus* more than the *Penicilliums*.

Of the *Penicilliums* the *P. olivaceum* was by far the most resistant to the action of tannin.

The range of spore formation is in the majority of cases much less than the range of growth, but in many cases a small amount of tannin appears to stimulate spore formation.

SUMMARY FOR SERIES III.

A study of this series of tables will show the same facts as were brought out in Series I, and will also show that—

1. The spores are more resistant to tannin on nutrient medium than in distilled water.

2. Low percentages of tannin in distilled water may stimulate growth, and apparently serves as a food for the fungus.

3. The time required for germination is frequently increased by the use of tannin in the culture media.

TABLE XX.

Aspergillus sp.

Hours	24		48		72			96			120		144		7d	8d	9d
	Gm	Gw	Gm	Gw	Gm	Gw	S	Gm	Gw	S	Gm	S	Gm	S	S	S	Gm
H_2O					0												
.025					100	E								A			
.05					100	D								A			
.1					100	C								A			
.2					100	B						A		A			
.4–.6					100	A						A		A			
.8					100	B								A			
1–16					100	C									A		
20–32					100	D										A	
I	100	C				A	B			B							
.025	100	B				A	B			B							
.05–.2	100	A				A	B			B							
.4	100	B				A	A			A							
.6–.8	100	C				B	B			B							
1	100	D				C	B			B							
2	100	D				C	C			C							
4	100	E				D	C			C							
8	100	F				E	C			C							
12	100	F				E				D							
16	100	G				E				E							
20	100	G				G				F							
24	100	H				H				F							
28	100	H				H								G			
32	100	I				I								G			
II			95	E						D							
.025			100	D						D							
.05			100	C						C							
.1			100	B						B							
.2			100	A						A							
.4			100	A						A							
.6			100	B						A							
.8			100	B						B							
1, 2			100	C						B							
4			100	C						C							
8			100	D						C							
12			100	D													
16, 20			100	E													
24, 28			100	F													
32			100	G													
IV			75		100	B		100	B								
.025			66		100	A		100	B								
.05			74		100	A		100	A								
.1			70		100	A		100	A								
.2			41		100	C		100	A								
.4			53		100	B		100	A								
.6			39		100	B		100	A								
.8					100	B		100	B								
1, 2					100	C		100	C								
4											100						
8													100				
12																	100
16																	64
20																	54
24																	36
28																	49
32																	42
V			44	C	100	A				B							
.025			19	C	100	A				B							
.05			58	B	100	A				B							
.1			60	B	100	A				B							
.2			100	B	100	A				A							
.4 .6			100	A	100	A				A							
.8 1			100	A	100	B				A							
2			80	B	100	B				B							
4			94	B	100	B				B							
8			67	C	100	C				C							
12			63	D	100	C				D							
16, 20					100	C				D							
24								100	E								
28																	

(Pages 41 and 42)

TABLE XXI.

	U. caryophyllinus	U. solidaginis		U. trifolii		Ustilago zeae	
Hours	24	24	48	24	48	24	72
	Gm	Gm	Gm	Gm	Gw	Gm	S
I	O	70	..	67	A	100	B
.025	..	..	..	59	A	100	B
.05	..	..	..	60	B	100	B
.1	..	..	..	..	..	100	A
.2	..	..	..	..	..	100	B
.4	..	..	..	..	..	100	C
.6	..	..	..	..	..	100	..
II	100	0	..	92	..	..	..
.025	36	..	..	84	..	..	..
.05	44	..	..	88	..	..	..
.1	46	..	..	63	..	..	.
.2	31	..	..	79	..	..	..
.4	17	..	..	36	..	..	..
.6	..	..	..	18	..	..	..
.8	..	..	..	18	..	..	..
IV	44	24	47	40	..	..	.
.025	64	34	52	24	..	..	..
.05	60	..	..	..	..	..	..
V	59	O	O	O	..	100	..
.025	64	..	..	O	..	100	..
.05	37	..	..	62	..	100	..
.1	29	..	..	57	..	100	..
.2	14	..	..	42	..	100	..
.4	6	..	..	..	..	100	..
.6	..	..	..	..	..	100	..
H_2O	100	..	..	88	..	100	..

TABLE XXII.

		Water & Tannin	I	II	IV	V	VI	XII	XIII
Glocosporium musarum	Range of germination	C &.025	..	C—.8	C—.1	..	C—.1	..	..
	Complete germination	C &.025	..	C—.6	C—.1	..	C &.025	..	..
	Best growth	..	..	C &.025	.025	..	C	..	..
	Range of spore formation	..	..	C—.6	C—.05	..	.025	..	..
	Best spore formation	..	..	C &.025	.05	..	.025	..	..
Glocosporium sp. from cacao.	Range of germination	C &.025	..	..	C—.4	..	..	..	C—.2
	Complete germination	C &.1	..	..	C—.2	..	..	..	C—.1
	Best growth	..	..	..	C—.05	..	..	..	C—.05
	Range of spore formation	..	..	..	C—.1	..	..	..	C—.1
	Best spore formation	..	..	..	.025	..	..	..	.025
Gloeosporium sp. from guavo.	Range of germination	C—.05	..	..	..	..	..	C—.1	..
	Complete germination	C— .05	..	..	..	..	..	C—.1	..
	Best growth	C &.025	..	..	..	..	..	C &.025	..
	Range of spore formation	..	..	..	..	..	..	..	..
	Best spore formation	..	..	..	..	..	..	C	..
Gloeosporium sp. from mango.	Range of germination	C &.025	..	..	..	..	C—.6	..	..
	Complete germination	C	..	..	..	..	C—.4	..	..
	Best growth	..	..	..	..	..	C &.025	..	..
	Range of spore formation	..	..	..	..	..	C—.2	..	..
	Best spore formation	..	..	..	..	..	.05 —.1	..	..
Gloeosporium sp. from Persea.	Range of germination	..	..	..	C—.1	..	C—.2	C	..
	Complete germination	..	..	..	C—.1	..	C—.2	C	..
	Best growth	..	..	..	.1	..	C—.025	C	..
	Range of spore formation	..	..	..	C—.1	..	C—.025	C	..
	Best spore formation	..	..	..	C &.05	..	C—.025	C	..
Glomerella rufomaculans	Range of germination	C—.1	..	C—.6	..	..	C—.4	..	..
	Complete germination	C—.1	..	C—.4	..	..	C—.4	..	..
	Best growth	.05	..	C—.025	..	..	.05 & .1	..	..
	Range of spore formation	C—.1	..	C—.6	..	..	C—.1	..	..
	Complete spore formation	.05	..	.025—.1	..	..	.05 & .1	..	..

TABLE XXII.—(*Continued.*)

		Water & Tannin	I	II	IV	V	VI	XII	XIII
Colletotrichum gossypii	Range of germination	C—.2	..	..	C—.2	..	..	..	..
	Complete germination	..	..	..	C—.2	..	..	..	..
	Best growth	.05 &.1	..	..	C &.025	..	..	..	..
C. lagenarium	Range of germination	C &.025	..	C—.8	C—.2	..	..	..	..
	Complete germination	C &.025	..	C—.6	C—.2	..	..	..	..
	Best growth	..	..	.025 &.05	..	..	..	..	..
Fusarium sp. from tomato.	Range of germination	C &.025	..	C—.6	..	..	..	C	..
	Complete germination	C &.025	..	C—.6	..	..	..	C	..
	Best growth	..	..	C	..	..	..	..	..
	Range of spore formation	..	..	C—.6	..	..	..	..	..
	Best spore formation	..	..	C &.2	..	..	..	..	..
F. oxysporium	Range of germination	C—.2	..	C—.8	..	..	..	..	..
	Complete germination	C—.2	..	C—.6	..	..	..	..	..
	Best growth	.025 &.05	..	C—.05	..	..	..	..	..
	Range of spore formation	C—.05	..	C—.2	..	..	..	..	..
	Best spore formation	.025 &.05	..	C—.05	..	..	..	..	..
Fusarium sp. from banana.	Range of germination	C &.025	..	C—.6	..	..	..	..	..
	Complete germination	C &.023	..	C—.6	..	..	..	..	..
	Best growth	..	..	C—.05	..	..	..	..	..
	Range of spore formation	..	..	C—.2	..	..	..	..	..
	Best spore formation	..	..	C	..	..	..	..	..
Fusarium sp. from apple.	Range of germination	C—.1	..	C—.8	C—.6	..	..	C—.6	..
	Complete germination	C—.05	..	C—.8	C—.6	..	..	C—.6	..
	Best growth	..	..	C—.8	C—.4	..	..	.025—.1	..
	Range of spore formation	..	..	C—.1	C—.2	..	..	C—.4	..
	Best spore formation	..	..	.05	.05	..	..	C &.4	..
F. culmorum	Range of germination	C	..	..	C—.1	..	..	C	..
	Complete germination	C	..	..	C—.1	..	..	C	..
	Best growth	..	..	..	C	..	..	..	..

TABLE XXII.—(*Continued.*)

		Water & Tannin	I	II	IV	V	VI	XII	XIII
Cladosporium macrocarpum	Range of germination	C &.025	..	C—.1	..	..	C—.2	..	..
	Complete germination	C	..	C—.1	..	..	C—.1	..	..
	Best growth	..	..	C	..	..	C	..	..
	Range of spore formation	..	..	C—.6	..	..	..	..	..
	Best spore formation	..	..	C—.05	..	..	..	..	..
Penicillium olivaceum	Range of germination	C—32	C—32	C—32	C—32	C—32	..	..	..
	Complete germination	.025 32	C—32	C– 12	C- 12	C 32	..	..	..
	Best growth	C—32	C &.025	C—4	C—.4	.025 & 2	..	..	..
	Range of spore formation	C—32	C—20	C—32	C—32	C—12	..	..	..
	Best spore formation	C—2	C &.025	.1—2	.2—.4	1 & 2	..	..	..
P. aureum	Range of germination	C—.4	..	..	C—.6	..	C—.6	C—.1	..
	Complete germination	C—.2	..	..	C—.2	..	C—.6	C—.1	..
	Best growth	C—.1	..	..	.05	..	.05 & .1	C &.025	..
	Range of spore formation	C—.05	..	..	C—.2	..	C—.1	C—.1	..
	Best spore formation	.025	..	..	.1	..	C—.1	C	..
P. italicum	Range of germination	C—.025	..	..	..	..	C—.1	C—.05	..
	Complete germination	C—.025	..	..	..	..	C—.1	C—.05	..
	Best growth	..	..	..	..	..	C	C	
	Range of spore formation	..	..	..	..	..	C– .05	C—.05	..
	Complete spore formation	..	..	..	..	..	.025 &.05	C &.025	..
Aspergillus sp.	Range of germination	.025—32	C—32	C—32	C—32	C—24	.	.	..
	Complete germination	.025—32	C—32	.025—32	C—8	C—24	.	.	..
	Best growth	.4 & .6	C—.4	.2 & .4	.05	.2 — 1	..	..	..
	Range of spore formation	C– 32	C—24	C—8	..	..	..	..	..
	Complete spore formation	C—32	.4	.4	..	..	.	..	..

TABLE XXIII.

Gloeo. musarum

Hours	24		48	
	Gm	Gw	Gw	S
II				
.025				
.05				
.1	100	A	A	A
.2	100	A	A	A
.4	100	A	A	A
.6	100	A	A	A
.8	70	A	A	A
1	70	A	A	A
2	70	A	B	
4	O			

	24		48	
	Gm	Gw	Gm	S
IV				
.025				
.05	100	A		A
.1	100	B		A
.2			80	
.4			80	

After 1 day in 4%

.025			
.05	70		
.1	70		
.2	70		
.4	70		
.6	70		
.8	70		
1	70		
2	70		

After 1 day in 2%

.05	70		
.1	70		
.2	70		
.4	70		
.6	50		

After 2 days in 4%

.1	70		
.2	70		
.4	70		
.6	70		
.8	70		
1	70		

After 2 days in 2%

.1	70		
.2	70		
.4	70		

After 3 days in 4%

.1	65		
.2	65		
.4	65		
.6	65		
.8	65		
1	65		
2	65		

After 3 days in 2%

.05	70		
.1	70		
.2	70		

After 4 days in 4%

.1	64		
.2	64		
.4	64		
.6	64		
.8	64		
1	64		
2	64		
4	2		

After 4 days in 2%

.05	70	A	
.1	70	A	
.2	70	B	

After 5 days in 4%

.1	50		
.2	50		
.4	50		
.6	50		
.8	50		
1	50		
2	50		
4	2		

After 5 days in 2%

.05	70	A	
.1	70	A	
.2	70	B	

After 6 days in 4%

.1	60		
.2	60		
.4	60		
.6	60		
.8	60		
1	60		
2	60		

After 6 days in 2%

.05	70	A	
.1	70	A	
.2	70	B	

* In the following the media containing 4% to 2% tannin removed and IV substituted

	*	
	24h	48h
	Gm	Gw
.4	60	
.6		20
.8		20
1		20
2		20
4		

Gloeo. sp. from grape.

	24		48
	Gm		Gm
IV	100		
.025	100		
.05	100		
.1	80?		
.2			5

After 1 day in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

After 2 days in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

After 3 days in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

After 4 days in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

After 5 days in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

After 6 days in 2%

.05	80		
.1	80		
.2			2

G. rufomaculans.

	24			48
	Gm	Gw	S	S
II	100	A	A	
.025	100	A	A	
.05	100	B	A	
.1	100	B	A	
.2	100	C	A	
.4	100	C	A	
.6	100	D	B	
.8	70	E		
.1				

After 2 days in .8%

.025	100	A	A
.05	100	A	A
.1	100	A	
.2	100	A	
.4	100	A	
.6	100	A	
.8	100	A	
1			

After 2 days in .8%

.025	?	C	
.05	?	C	
.1	?	C	
.2	?	C	
.4	?	C	
.6	?	C	
.8	?	E	

After 3 days in .8%

.025	?	C	
.05	?	C	
.1	?	C	
.2	?	D	
.4	?	D	
.6	?	D	
.8	?	E	

After 4 days in .8%

.025	?		
.05	?		
.1	?		
.2	?		
.4	?		
.6	?		
.8	?		
1			

Media containing .1 to 1% tannin removed and IV substituted.

	24			48		72		
	Gm	Gw	Gw	S	Gm	Gw	S
II	100	IV	100	A	A	A		
.025	100	.025	100	A	A			
.05	100	.05	100	A	A			
.1	100	.1	100	A	B	?	A	A
.2	100	.2	100	B	C	?	A	
.4	100	.4				50	A	
.6	70	.6				50	A	
.8	70	.8				50	A	
1	70	1				50	A	
2	20	2						
4		4						

After 1 day in 2%

.1	90	.025	90	A	A
.2	90	.05	90	A	
.4	90	.1	90	B	
.6	90	.2	60	C	
.8	90	.4			50 A
1	4	.6			50 A
2	4	.8			50 A
		1			50 A

After 1 day in 1%

After 2 days in 2%

.05	70	.025	90	A	A
.1	70	.05	90	A	
.2	70	.1	90	B	
.4	70	.2	60	C	? A
.6	70	.4			? A
.8	12	.6			50 A
1	12	.8			50 A
		1			50 A

After 2 days in 1%

After 3 days in 2%

.05	60	.025	70	A	A
.1	60	.05	70	A	A
.2	60	.1	70	B	A
.4	60	.2	50	C	A
.6	60	.4			50 A
.8	12	.6			50 A
1	12	.8			50 A
2	2	1			50 A

After 3 days in 1%

After 4 days in 2%

.05	50	.025	70	A	A
.1	50	.05	70	A	A
.2	50	.1	70	B	
.4	50	.2	50	C	A
.6	50	.4			50 A
.8	14	.6			50 A
1	14	.8			50 A
2	2	1			50 A
		2			

After 4 days in 1%

After 5 days in 2%

.05	50	.025	70	A	A
.1	50	.05	70	A	A
.2	50	.1	70	B	
.4	50	.2	50	C	A
.6	50	.4			50 A
.8	50	.6			50 A
1	12	.8			50 A
2	3	1			50 A
		2			50 A

After 5 days in 1%

After 6 days in 2%

.05	50	.025	70	A	
.1	50	.05	70	A	
.2	50	.1	70	B	A
.4	50	.2	50	C	A
.6	17	.4			50 A
.8	10	.6			50 A
1	10	.8			50 A
2	4	1			50 A
		2			50 A

After 6 days in 1%

After 27 days in 2%

.05	60	A	
.1	60	A	

4. Different species of the same genus may vary in power of resistance, although grown on the same medium.

5. *Fusariums* are more resistant than *Gloeosporiums* and *Colletotrichums;* and *Cladosporiums* more resistant than the *Fusariums.*

6. As the maximum percentage of tannin at which spores will germinate is approached the mycelia tends to become short, thick and very septate.

SERIES IV.

It was next found necessary to determine whether the action of tannin was merely inhibitory or whether it killed the spores. If the latter, it would also be necessary to determine the strength of tannin and the time necessary to accomplish this result. For this purpose a series of experiments were conducted as follows:

A number of spores were put into tubes containing a certain medium to which a definite amount of tannin had been added. The percentage used was sufficient to prevent germination. At definite intervals spores were removed and put in drop cultures of the same medium containing lower percentages of tannin in which the spores were known to germinate if placed when fresh, *i. e.,* without having been previously exposed to a high or inhibiting percentage of tannin.

The results of these experiments are given in the following tables.

TABLE XXIII.

Glocosporium masarum Cooke, from banana was used in two different media. With medium No. II the germination was complete on check up to .6%, and about 70% from .8% to 2% tannin. When the spores were put in medium No. II+ 4% tannin for one or two days, and then in drop cultures the germination was approximately 70% in the various percentages of tannin up to and including 2%. In 4% tanning there was very slight germination. When kept in 4% tannin from three to six days, the percentages of germination dropped to approximately 65% and 50%.

Glocosporium musarum from banana with medium No. IV check gave complete germination to .1 and 80% germination on .2% and .4% tannin but the germination on .2% and .4% was much slower.

After one day in 2% tannin the germination was approximately 70% on .4% and 50% on .6% tannin.

When in 2% tannin from two to six days the germination was about 70% in .2% tannin, but no germination in higher percentages.

At the end of 20 days there was no germination whatever unless all the tannin was removed and replaced with fresh media without tannin, in which case there would be very slight germination.

If all the tannin were removed at the end of 5 or 6 days, and replaced with fresh media the power of germination would be increased slightly. (Fig. 33, a, b.)

The germination of *Gloeosporium* sp. from grape was not materially checked even after six days in 2% tannin.

Glomerella rufomaculans spores when kept in medium No. II plus .8% tannin for from one to four days and then transferred to the same medium with lower percentages of tannin, showed a very slight reduction of power to germinate, but the growth was retarded and frequently abnormal. When the same organism was kept in the same medium with 2% tannin for from one to six days and then transferred to the same medium with lower percentages of tannin, there was a gradual reduction of the power to germinate as will be readily seen by an examination of the table.

When in medium No. IV plus 1% tannin for one or two days the spores shows some reduction in power to germinate; for three to six days a greater reduction; 27 days a still greater reduction, as illustrated in the table (Fig. 34, a, b, c, d). However, if the medium containing tannin was removed from those which would not germinate, and replaced by pure medium without tannin, about 50% of the spores would germinate within the next 24 hours.

TABLE XXIV.

Fusarium sp. from apple when with medium No. IV plus 2% tannin for one to six days shows gradual reduction of power to germinate. In 12 days very pronounced reduction. In 36 days no germination. In the check the germination was complete up to and including .2%, the growth was practically the same as on pure media and up to .1% but greatly reduced on .2% (Fig. 35, a, b).

When kept for one day in the medium with 1% tannin and then transferred to the same medium with lower percentages of tannin power to germinate on .2% was lower, but the growth on .025 and .05% was stimulated (Fig. 36, a, b, c).

When kept in same for two days and then transferred there was a lowering of the power to germinate, but no material difference in the growth of those that did germinate (Fig. 37, a, b, c).

TABLE XXIV.

Fusarium sp. (from apple).

Hours	24		48	72	120	24		48	72	120	24		48	72	120	24		48	72	120
	Gm	Gw	Gm	Gm	Gm	Gm	Gw	Gm	Gm	Gm	Gm	Gw	Gm	Gm	Gm	Gm	Gw	Gm	Gm	Gm
						After 2 days in 1%					After 4 days in 1%					After 6 days in 1%				
IV	100	..	..	..	..	95	A	..	..	..	82	A	..	..	..	69	A	..	..	..
.025	100	..	..	..	..	94	A	..	..	..	75	A	..	..	..	73	A	..	..	..
.05	100	..	..	..	..	93	A	..	..	..	78	A	..	..	..	69	A	..	..	..
.1	100	..	..	..	..	86	B	..	..	..	82	A	..	..	..	72	A	..	..	..
.2	100	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	50	..	..	..	..	50	..	..
.4	..	..	..	50	..	..	..	18	..	..	..	..	5	..	..	..	..	10	..	..
.6	..	..	..	10	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	5	..	..	2	..	..
.8	..	..	..	..	..	..	..	1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	After 1 day in 1%					After 3 days in 1%					After 5 days in 1%					After 12 days in 1%				
.025	100	A	..	..	..	82	A	..	..	..	70	A	..	..	..	2	..	..	..	..
.05	100	A	..	..	..	84	A	..	..	..	77	A	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	100	B	..	..	..	81	A	..	..	..	72	B	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	86	C	..	..	..	77	B	..	..	..	67	C	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	..	..	50	..	..	..	..	30	..	..	..	..	50	..	..	..	..	..	..	..
.6	..	..	12	..	..	..	..	..	..	..	..	..	5	..	..	..	..	..	..	..
.8	..		..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	2	..	..	..	..	..	..	..

When kept in same for three days and then transformed there was a still greater reduction of the power to germinate, but no material difference in the growth of those that did germinate. The spores on the higher percentages of tannin in this and in the preceding experiments showed plasmolysis and peculiar abnormal efforts to germinate (Fig. 38, a, b, c).

When kept in same for four or five days and then transferred the power to germinate was reduced, but those which did germinate grew somewhat better than when kept for two and three days.

When kept in same for six days the power to germinate was slightly reduced, but the growth was practically the same as in the preceding (Fig. 39).

When kept for twelve days in same, only 2% germinated in .025% of tannin. The spores had undergone plasmolysis, and in some cases showed peculiar abnormal efforts to germinate (Fig. 40, a, b). When transferred to pure medium without tannin they were unable to regain their power to germinate and were evidently dead (Fig. 40, a, b).

When kept in same for twenty-four days the results were practically the same as in the preceding. In thirty-six days the power to germinate was entirely lost.

TABLE XXV.

Penicillium aureum when kept in medium No. IV plus .6% tannin for one, two, three and four days, showed considerable reduction in power to germinate (see table) but the results were somewhat irregular.

P. italicum when in medium No. IV plus 1% tannin for one to six days, showed gradual reduction in power to germinate. At the end of 28 days, no germination unless put in II when the germination was slight.

The growth on the check was better on .025% tannin than on pure medium (Fig. 41, a, b, c, d). When kept in 1% tannin for one day and then transferred to lower percentages of tannin the growth on .025% and .05% was practically the same with a reduction on .1% (Fig. 42. a, b, c). The spores on .4% to 1% did not germinate and six days later were transferred to pure medium No. IV without tannin in which about 3% germinated. (Fig 42, d, e, f, g.)

TABLE XXV.

Hrs.	Penicillium aureum 24 Gm	24 Gw	48 Gm	48 Gw	48 S	72 Gm	72 Gw	72 S	96 Gm	96 Gw	96 S	120 Gm	120 Gw	120 S	144 Gm	168 Gm	P. italicum. 24 Gm	24 Gw	48 Gm	72 Gm
IV	100	..	..	A	..	..	A	..	..	A	A	..	..	..	..	..	100	B	..	..
.025	100	..	..	A	..	..	A	..	..	A	A	..	..	..	..	..	100	A	..	..
.05	75	..	100	B	..	..	B	..	..	B	A	..	..	..	..	..	100	B	..	..
.1	..	..	34	C	..	100	C	..	..	C	A	..	..	..	..	..	..	..	26	..
.2						28	D	..	100	D		..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4						..	..	..	34	E		..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6						..	..	..	34	E		..	..	..	..	..	..	..	..	..
	After 1 day in .6%																After 1 day in 1% Removed to pure IV			
.025	68	A	..			..	B	A	..			..	..	..	..	..	100	A	..	..
.05	74	A	..			..	A	B	..			..	..	..	..	..	100	A	..	..
.1	69	B	..			..	C	..	..			..	..	..	..	..	100	B	..	..
.2	32	C	..			..	D	..	..			..	..	..	..	..	..	..	..	3
.4	..	..	..			..	..	..	22			..	..	..	..	..	..	..	..	3
.6	..	..	..			..	..	..	25			..	..	..	..	..	..	..	..	3
	After 2 days in .6%																After 2 days in 1% Removed to pure IV			
.025	28	..	..			100	A	..	..		A	..	A	A	..	..	100	A	..	..
.05	26	..	..			100	B	..	..		B	..	B	A	..	..	100	B	..	..
.1	..	..	8	..		16	C	..	..		..	100	C	B	..	..	54	C	..	..
.2	..	..	17	..		18	C	..	..		..	100	C	..	..	..	..	..	..	1
.4	..	..	..	..		..	..	..	..		..	23	D	..	..	..	..	..	..	1
.6	..	..	..	..		..	..	..	..		..	22	D	..	..	..	..	..	..	1
	After 3 days in .6%																After 3 days in 1% Removed to pure IV			
.025	26	..	..			26	B	..	100	A	A	..	..	A	100	100	100	A	..	..
.05	30	..	..	..		30	A	..	100	A	A	..	..	A	100	100	100	B	..	..
.1	..	..	20	..		20	C	..	20	B	..	..	..	B	100	100	59	C	..	..
.2	..	..	18	..		18	D	..	18	C	..	..	..	B	100	100	..	..	..	4
.4	..	..	..	..		..	..	..	26	D	..	..	..	..	26	100	..	..	..	4
.6	..	..	..	..		..	..	..	..		..	..	..	..	26	100	..	..	..	4
	After 4 days in .6%																After 4 days in 1% Removed to pure IV			
.025	59	..	..	A	A	..	..	..	..	..	A	..	..	A	..	..	100	..	..	..
.05	33	..	..	B	B	..	..	..	..	..	B	..	..	A	..	..	100	..	..	..
.1	..	..	33	C	..	..	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..	..	O
.2						22	..	..	..	..	C	..	..	B	..	..	..	..	..	..
.4						..	..	..	..	..	..	..	20	..	..	..	..	..	..	..
.025																	After 5 days in 1% 100			
.05																	54			
025																	After 6 days in 1% 100			
.05																	64			
.025																	After 28 days in 1% 4			
.025																	After 39 days in 1% 0			
025																	After 39 days in 1% transferred to II plus tannin as follows: 2			
.05																	1			
.1																	½			
.2																				1
.4																				1

When kept for two days in 1% tannin the growth was better on .025% than on .05% and .1% (Fig. 43, a, b, c).

When kept in same for three, four, five, and six days, the character of the growth was practically the same. When spores in the higher percentages, which did not germinate, were transferred to pure media about 1% would germinate. (See table.)

SUMMARY OF SERIES IV.

The results of this series of experiments indicates that the first effect of tannin is to retard the germination of the spores and the second effect is to kill them. It is also evident that some spores are more resistant than others of the same species.

SERIES V.

This series of experiments consisted in germinating the spores in a pure medium without tannin and then transferring to the same medium with various percentages of tannin.

TABLE XXVI.

Two species of *Gloeosporium* were used in two different media. Examination of this table will show that in one case there was an increased growth on .05 and .1% and in all cases a decrease in growth beginning with .1% and .2%. In no case was there a growth beyond 4%. There was also a gradual decrease in spore formation and in all cases no spore formation beyond 2%. These cultures were allowed to stand for 10 to 13 days, but in no case was there a material change after the second day.

Comparing *Gloeosporium musarum* with results in Table XVI it will be seen that the germination is inhibited by 1% on medium No. II, but if germinated in a pure medium and then transferred to the same medium containing tannin there will be a growth on 2%. On medium No. IV the germination will be inhibited by .2% but the growth will not be inhibited with less than 1%.

Glomerella rufomaculans was used on two different media. Examination will show a gradual checking of both growth and spore formation. There was a very slight increase in growth up to the fourth day. These cultures were allowed to stand for 8 to 10 days.

Comparing this table with Table XVI it will be found .8% tannin on medium No. II will inhibit germination, but that it requires

TABLE XXVI.

	G. musarum					Gloeo. sp. from grape					G. rufomaculans				G. macrocarpum			F. oxysporium			P. italicum				
	24 hrs.		4d.		10d.	24 hrs.		3d.		9d.	24 hrs.		4d.	9d.	24 hrs.		7d.	24 hrs.		9d.	24 hrs.		2d.		8d.
	Gw	S	Gw	S		Gw	S	Gw	S		Gw	S			Gw	S		Gw	S		Gw	S	Gw	S	
II	B	C	B	..	..	A	A	..	..	..	B	B	..	..	A	B	..	A	B	..	A	B	..	..	..
.05	A	C	A	..	..	A	A	..	..	..	C	B	..	..	A+	A	..	A	B	..	A	C	..	..	..
.1	A	C	A	..	..	B	B	..	..	..	C	B	..	..	A	A	..	A	B	..	A	C	..	..	..
.2	C	D	C	..	..	B	..	B+	A	..	C	B	..	..	A	A	..	A	B	..	A	C	..	C	..
.4	C	..	C+	C	..	C	..	B+	A	..	C	B	..	..	A	A	..	A	B	..	B	..	B+	C	..
.6	D	..	C+	C		C	..	B+	A		C	B	..		A	A		A	B		B	..	B+	C	..
.8	D	..	C+	C		C	..	B+	A		C	B	..		A	C		B	C		B	..	B+	C	
1	E	..	D	C		C	..	B+	A		E	B	..		A	C		B	C		B	..	B	E	
2	E	..	D	C		E	..	C	C		E	B	..		B	E		C	C		..	..	B	E	
4	..	..	..	..	No change	..	..	E	..	No change	..	..	F	No change	B	E	No change	E	..	No change	..	..	..	..	No change
IV	A	B	A	..		A	B	..	..		B	B	..		C	C		..	..		..	..	..	..	
.05	B	C	B	..		A	B	..	..	..	..	..	..	..	C	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.1	B	C	B	..	..	B	..	..	C	..	C	B	..	..	C	C	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.2	C	..	C	C	..	B	..	..	C	..	D	B	..	..	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.4	C	..	C	..	..	B	..	..	..	..	F	..	..	..	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.6	D	..	D	..	..	C	..	..	..	..	..	..	F	..	D	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..
.8	D	..	D	..	..	..	..	..	..	..	..	..	F	..	F	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

more than 2% tannin to check growth of spores previously germinated in pure medium. With medium No. IV the limitations for germination and growth appear to be the same.

Cladosporium macrocarpum, Preuss., was used on two different media. Examination of the table will show that it was decidedly resistant to tannin on medium No. II. Both growth and spore formation were stimulated by .05% and there was some growth on 8%. Medium No. IV was less favorable for this organism, which also proved much more susceptible to tannin than on medium No. II.

Comparing this table with Table XVIII it will be seen that although the germination is inhibited with 2%, the organism would grow on 8% if previously germinated in pure medium.

Fusarium oxysporium was used on a single medium. The tannin showed practically no effect until .8% was reached, when there was a reduction in both growth and spore formation. There was no growth beyond 8% on the ninth day.

Comparing these results with Table XVII it will be seen that on medium No. II the germination will be inhibited with 1% but if germinated in pure medium and then placed in tannin there would be some growth on 4%.

Penicillium italicum was used with medium No. II. Examination of the table will show that there was a partial checking of the growth with .4% tannin and a complete inhibition on 8%.

SUMMARY OF SERIES V.

The result of this series of experiments very clearly shows that low percentages of tannin may stimulate germination and that when spores are germinated without the tannin the growing fungus will tolerate tannin considerably in excess of the amount necessary to inhibit germination.

SERIES VI—CORK TESTS.

Sheets of cork, from selected material and cut 1-300 inch in thickness, were soaked in water, or in alcohol, or boiled in water to remove the tannin. All were sterilized and spread on agar plates. A small block of the agar was placed on the center of the sheet and inoculated with spores. It was found that the mycelium penetrated the cork

readily and produced an abundant growth in the medium below the cork.

The time required for penetration was for—

Alternaria solani	4 days
Diaporthe parasitica	5 "
Gloeosporium fructigenum	4 "
Sclerotinia functigena	4 "
Chætomium sp.	3 "
Gloeosporium sp. (vanillæ)	4 "
Glomerella gossypii	1 day

A second series of experiments were made in each of which two sheets of cork were treated as above and one was afterwards soaked in 8% tannin. The following organisms were used: *Rhizoctonia, Gloeosporium* (from grape), *Gloeosporium* (from vanillæ), *Penicillium aureum, Fusarium, Gloeosporium* (persea), *Necosmospora vasinfecta, Gloeosporium* (from guava), *Glomerella gossypii,* and *Cladosporium.* In all cases the mycelium readily penetrated the cork from which the tannin had been removed. In most cases it did not penetrate the cork containing tannin, and when it did penetrate, the growth was very slight.

In these experiments it was found necessary to use a higher percentage of tannin than was required to inhibit the growth in the medium itself.

In the next series of experiments, the surface of an agar plate was painted with tannin. The following organisms were then placed on this painted surface: *Rhizoctonia, Fusarium oxysporium, Gloeosporium* (from persea), *Gloeosporium* (from grape), *Gloeosporium* (from guava), *Gloeosporium* (from vanillæ), *Necosmospora vasinfecta, Glomerella gossypii, Penicillium aureum, P. italicum,* and *Cladosporium macrocarpum.*

At the same time checks were prepared in the same manner, but without tannin. In all cases the growth was best without tannin. The best growth with tannin was made by *Rhizoctonia.*

Blocks of agar containing the same organisms were allowed to stand one hour in 8% tannin. One block of each was then planted on agar and one block of each washed in distilled, sterilized water. The growth in all cases was much better where the blocks were washed in the water.

Circles of 8% tannin were painted on agar plates and the same organisms planted in the center of these circles. The growths were always checked in their spread but eventually passed beneath the tannin. When the painting of the circles was accompanied with the cutting of a trench with a sterilized knife, the progress of the organisms were either checked or stopped.

GENERAL SUMMARY.

1. The first action of tannin is to inhibit germination, and finally to kill the spores.

2. The time required for germination is frequently increased by the use of tannin in the media.

3. Low percentages of tannin in distilled water may stimulate germination and growth, and apparently serves to some extent as a food.

4. Different species of the same genus may vary in power of resistance, although grown in the same medium.

5. Some spores are more resistant than others of the same species.

6. As the maximum percentage of tannin in which spores will germinate and grow is approached, the mycelium tends to become short, thick, and very septate.

7. Tannin has a tendency to retard or inhibit the growth of fungi.

8. The parasitic forms are more sensitive to the action of tannin than the saprophytic forms.

9. The organisms will tolerate more tannin when grown in media suitable to their growth than when grown in unsuitable media.

10. The majority of parasites used were retarded by .1% to .6% tannin.

11. In some cases the growth was at first retarded by certain percentages of tannin, and later became as good or even more luxuriant than on the medium without tannin.

12. *Fusariums* are more resistant than *Glocosporiums* and *Colletotrichums;* and the *Cladosporiums* are more resistant than the *Fusariums*. *Penicillium olivaceum* was the most resistant of any species used.

13. Low percentages of tannin may stimulate germination, but when spores are germinated without tannin the mycelium will tolerate more tannin than that necessary to inhibit germination.

14. The fruiting was frequently stimulated by low percentages of tannin.

15. The action of tannin is practically the same whether the organism is grown in agar or liquid media.

16. It is the tannin and not the cell wall that is most important in checking the growth of mycelium.

17. Commercial tannin is slightly more toxic than the fresh extract.

18. Tannin is slightly more toxic than sodium tannate.

The results given by Massee, Ward, Myoshi, and others indicate that there is a direct relation between the cell contents of the host plant and the parasite; that the power of the host plant to resist the parasite is due to internal substances rather than to the structural characters.

Pfeffer and some few other writers are inclined to consider the tannin as something more than a by-product, and believe that it affords protection from insects and other enemies of the plant.

The preceding results in some respects confirm the investigations of Massee, Ward, and others concerning the positive and negative chemotactic action on the germ tubes of the fungi. Although the investigations of these men gave important evidence of the chemotactic action of the cell contents on the germ tubes of the fungi, they did not demonstrate the particular substance or substances which are chemotactic. Neither has the writer thus far demonstrated the factors in this chemotactic action; but it appears that tannin is an important factor and that its importance varies in accordance with the other substances with which it is associated in the cells of the host plant. While tannin no doubt serves as a protective agent, its efficiency in this direction will vary somewhat with the character of the other substances within the cell. This may account for the variation in power of resistance between species, varieties, and individual plants.

The fact that plants which produce large quantities of tannin are subject to disease is no argument against the preceding. The organisms may live in tissues which bear little or no tannin or which contain other substances that in a measure counteract the influence of the tannin. Furthermore, some species of fungi are much more resistant to tannin than others, and the species which attack these high tannin bearing plants no doubt possess this quality.

In the case of the so-called cork protection of the plant the tannin, rather than the suberized cell walls, doubtless serves to protect the plant against those parasites which gain entrance only through wounds.

If tannin be considered alone, it presents a number of apparently contradictory facts, but when taken in connection with other substances the contradictions disappear and we are enabled to give at least a tentative explanation of certain phenomena. The fact that the sapwood contains such relatively large quantities of food materials makes it especially suitable for the fungi which may enter the newly cut timber or wounds, while the seasoned heart wood is much more resistant. However, the fact that seasoned heart wood is resistant while the heart wood of living timber is so susceptible to the attacks of wound parasites has proved a puzzling question for writers on this subject. The writers offer this tentative explanation; the heart wood of the living tree contains a relatively small amount of food and a great deal of water, the tannin having united with the cellulose of the cell wall. Therefore, the parasites do not contend with the maximum amount of tannin and are possibly able to utilize the small amount with which they do come in contact for food. Furthermore, having probably germinated under more favorable conditions in the sapwood and gradually worked into the heart they are able to resist a relatively high percentage of tannin. In the seasoned timber the moisture and probably the food supply have been reduced, making unfavorable conditions for the germination and early growth of the organism.

It is well known that tannin always accumulates in the injured tissues; that it is always formed quickly and abundantly in wounds. It is possible that its presence there may serve to check or prevent the germination of the spores of many organisms which would otherwise find suitable nutriment in the escaping fluids of the host plant.

Note.—Since preparing this manuscript, further investigation by Dr. H. P. Bassett, who has recently been associated with the author, has shown that the amount of tannin in fruits varies with certain factors, such as injury, length of time between removal from tree and analysis, etc. The presence and relative amount of this tannin or tannin-like body is controlled by the presence of certain enzymes which vary in amount and activity during the growth of these fruits. These enzymes are now being studied and will be the subject for a later paper.

EXPLANATION OF PLATES.

ALL THE DRAWINGS AND PHOTOGRAPHS ARE BY MR. J. J. TAUBENHAUS.

Figure 1.—*Gloeosporium fructigenum* (?) from grape. Grown on medium II with percentages of tannin ranging from .025% to .4%.

Figure 2.—Same. Grown on medium IV with tannin ranging from .025% to .2%, to be compared with Fig. 1.

Figure 3.—*Lentodium squamulosum* on medium VI with check and percentages of tannin ranging from .025% to .4% after one week's growth. Best growth on .025% tannin, gradually decreasing with increased amounts of tannin. Growth of .1% tannin about equal to growth on check.

Figure 4.—Same as Fig. 3 at end of two months.

Figure 5.—*L. squamulosum* on medium VI same as in Figs. 3 and 4, but with 20 grams absorbent cotton in each flask. Same age as Fig. 4. Best growth on .2%.

Figure 6.—*Cephalothecium roseum* on medium II. Stimulation with .05% tannin.

Figure 7.—*Rhizoctonia* sp. on medium IV showing retardation with .1% and .2% tannin.

Figure 8.—*Glomerella psidii* from guava grown in distilled water.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "

Figure 9.—*Glomerella gossypii* grown in distilled water.

a. Check.....7 days
b. With .025% and .05% tannin 7 "
c. " .1% tannin.....7 "
d. " .2% " .....7 "

Figure 10.—*Glomerella rufomaculans* grown on medium II.

a. Check and .025% tannin...24 hours
b. With .05% and .1% tannin..24 "
c. " .2% tannin.....24 "
d. " .4% and .6% tannin..24 "

Figure 11.—*Colletotrichum lagenarium* grown on medium II.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 " Same on .05% tannin
c. " .1% " ..24 "
d. " .2% " ..24 "
e. " .4% " ..24 " Same on .6% tannin
f. " .8% " ..48 "

Figure 12.—*Gloeosporium* sp. from Cacao grown on medium IV.

a. Check.....24 hours. Same on .025% tannin
b. With .05% tannin..24 "
c. " .1% " ..24 "
d. " .2% " ..24 "
e. " .4% " ..24 "

Figure 13.—*Gloeosporium* sp. from Cacao grown on medium XII.

a. Check.....24 hours. Same on .025% tannin
b. With .05% tannin..24 "
c. " .1% " ..24 "
d. " .2% " ..48 "
e. " .4% " ..72 "

Figure 15.—*Fusarium* sp. from apple grown in distilled water.

a. Check.....24 hours. Same on .025% tannin
b. With .05% tannin..24 "
c. " .1% " ..24 "
d. " .2% " ..

Figure 16.—*Fusarium* sp. from tomato grown in water.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin.24 "

Figure 17.—*Fusarium oxysporium* grown on medium II.

a. Check.....24 hours. Same on .025 and .05% tannin.
b. With .1% tannin...24 "
c. " .6% " ...24 "
d. " .8% " ...24 "

Figure 18.—*Fusarium culmorum* grown on IV.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "
d. " .1% " ..24 "

Figure 19.—*Fusarium* sp. from apple grown on IV.

a. Check.....24 hours. Same on .025 and .05% tannin.
b. With .1% tannin....24 " Same on .2 and .4% tannin.
c. " .6% " ....24 "

Figure 20.—*Cladosporium macrocarpum* grown on medium II.

a. Check.....24 hours. Same on .025% tannin
b. With .05% tannin..24 " Same on .1% tannin
c. " .2% " ..24 " Same on .4% tannin
d. " .6% " ..24 "
e. " .8% " ..24 "
f. " 1% " ..24 "

Figure 21.—*Cladosporium macrocarpum* grown on medium VI.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .1% " ..24 "
d. " .2% " ..72 "

Figure 22.—*Penicillium olivaceum* grown on distilled water.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "
d. " 16% " ..24 "
e. " 32% " ..24 "

Figure 23.—*Penicillium olivaceum* grown on medium II.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 " Same on 1% tannin
d. " .2% " ..24 " Same on .4, .6 and .8% tannin.
e. " 1% " ..24 "
f. " 2% " ..24 "
g. " 4% " ..24 "
h. " 8% " ..24 "
i. " 12% " ..24 "
j. " 16% " ..24 " Same on 28% tannin
k. " 32% " ..24 "

Figure 24.—*Penicillium olivaceum* grown on medium V.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "
d. " .1% " ..24 " Same on .8% tannin
e. " 1% " ..24 " Same on 2% tannin
f. " 4% " ..24 "
g. " 8% " ..24 " Same on 12% tannin
h. " 16% " ..24 "
i. " 20% " ..24 "
j. " 24% " ..24 " Same on 32% tannin

Figure 25.—*Penicillium aureum* grown on medium IV.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "
d. " .1% " ..24 "
e. " 2-5% " ..72 "
f. " 3-5% " ..96 "

Figure 26.—*Aspergillus* sp. grown on distilled water.

a. With .025% tannin..72 hours
b. " .05% " ..72 " Same on .1% tannin
c. " .2% " ..72 "
d. " .4% " ..72 " Same on .6% tannin
e. " .8% " ..72 "
f. " 1% " ..72 " Same on 16% tannin
g. " 20% " ..72 " Same on 32% tannin

Figure 27.—*Aspergillus* sp. grown on medium II.

a. Check.....48 hours
b. With .025% tannin..48 "
c. " .05% " ..48 "
d. " .1% " ..48 "
e. " .2% " ..48 " Same on .4% tannin
f. " .6% " ..48 " Same on .8% tannin
g. " 1% " ..48 " Same on 8% tannin
h. " 12% " ..48 " Same on 16% tannin
i. " 20% " ..48 " Same on 24% and 28% tannin
j. " 32% " ..48 "

Figure 28.—*Uromyces caryophyllinus* grown on medium II.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 " Same on .05% tannin
c. " .1% " ..24 " Same on .2% tannin

Figure 29.—*Uromyces caryophyllinus* grown on medium V.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 " Same on .4% tannin

Figure 30.—*Uromyces soladaginis* grown on IV.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "
c. " .05% " ..24 "

Figure 31.—*Uromyces trifolii* grown on medium IV.

a. Check.....24 hours
b. With .025% tannin..24 "

Figure 32.—*Ustilago zeae* grown on medium I.

a. With .025% tannin..24 hours
b. " .05% " ..24 "

Figure 33.—*Gloeosporium musarum* kept in medium IV with 2% tannin for six days.

a. Then transferrd to medium IV with .05% tannin 24 hours.
   Growth was same when transferred to .1% for 24 hours.
b. Then transferred to medium IV with .2% tannin 24 hours.

Figure 34.—*Glomerella rufomaculans* kept in medium IV with 1% tannin for six days.

a. Then transferred to .05% tannin 24 hours
b. " " .1% " 24 "
c. " " .2% " 24 "
d. " " .4% " 24 "

Figure 35.—*Fusarium* sp. from apple grown in medium IV.

a. Check at end of 24 hours, when the growing spores were transferred to .025 or .05% tannin for 24 hours the growth was same as on the check.
b. Growth at the end of 24 hours after having been transferred to .2% tannin.

Figure 36.—*Fusarium* sp. from apple kept in medium IV with 1% tannin for one day.

a. Then transferred to .025% tannin 24 hours
b. " " .1% " 48 "
c. " " .2% " 48 "

Figure 37.—*Fusarium* sp. from apple kept in medium IV with 1% tannin for two days.

a. Then transferred to .025% tannin 24 hours
b. " " .2% " 24 "
c. " " .4% " 24 "

Figure 38.—*Fusarium* sp. from apple kept in medium IV with 1% tannin for three days and then transferred to medium IV.

a. With .025% tannin 24 hours
b. " .2% " 24 "
c. " .6% " 24 "

Figure 39.—*Fusarium* sp. from apple kept in medium IV with 1% tannin for six days and then transferred to medium IV, with .025%.

Same growth with .05%, .1% and .2% tannin.

Figure 40.—*Fusarium* sp. from apple kept in medium IV with 1% tannin for twelve days and then transferred to medium IV.

With a. .025% tannin..24 hours
b. .05% " ..24 "

Figure 41.—*Penicillium italicum* kept in medium IV.

a. Medium IV.....24 hours
b. " " with .025%..24 "
c. " " " .05%..24 "
d. " " " .1%..48 "

Figure 42.—*Penicillium italicum* kept in medium IV with 1% tannin for one day and then transferred to

a. { Medium IV / " " with .025% tannin / " " " .05% " } ..24 hours
b. " " " .1% " ..24 "
c. " " " .2% " ..96 "
d. " " " .4% " .. 7 days and then transferred to medium IV. Growth in 24 hours.

e. Medium IV with .6% and then treated same as d
f. " " .8% " " " d
g. " " 1% " " " d

Figure 43.—*Penicillium italicum* kept in medium with 1% tannin for two days and then transferred to

a. Medium IV with .025% tannin..24 hours
b. " " " .05% " ..24 "
c. " " " .1% " ..24 "

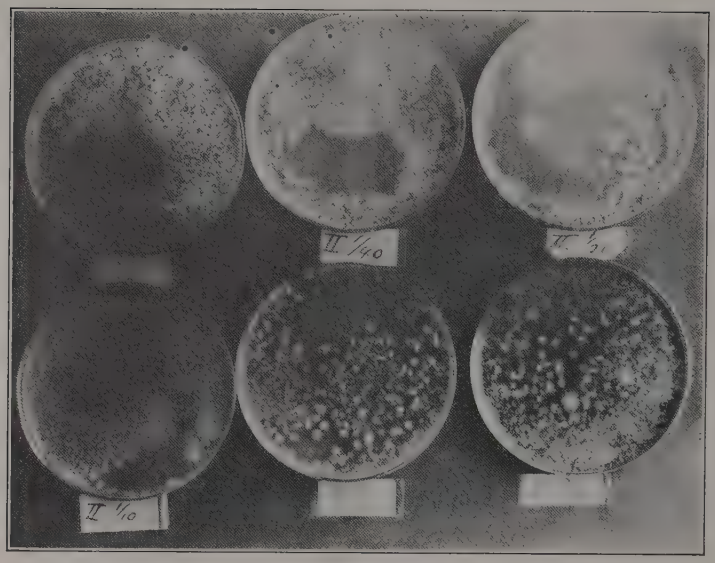


FIG. 1

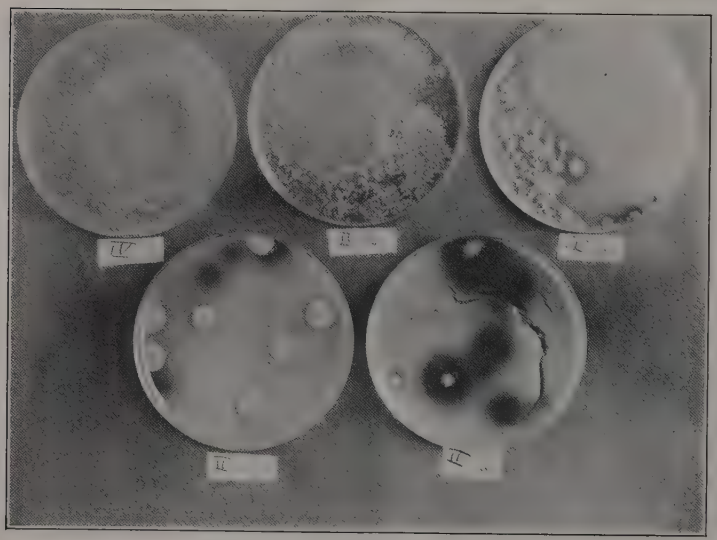


FIG. 2

FIG. 3

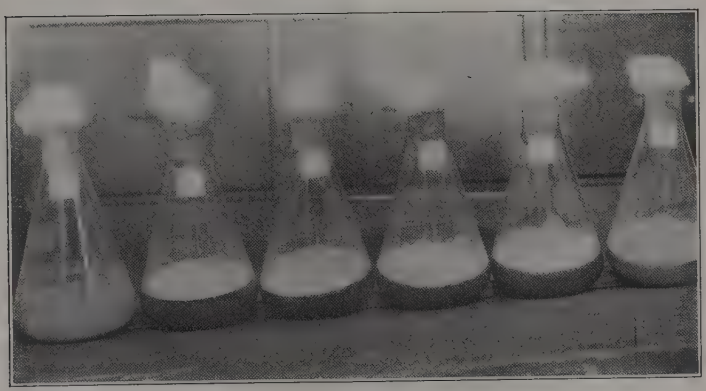


FIG. 4

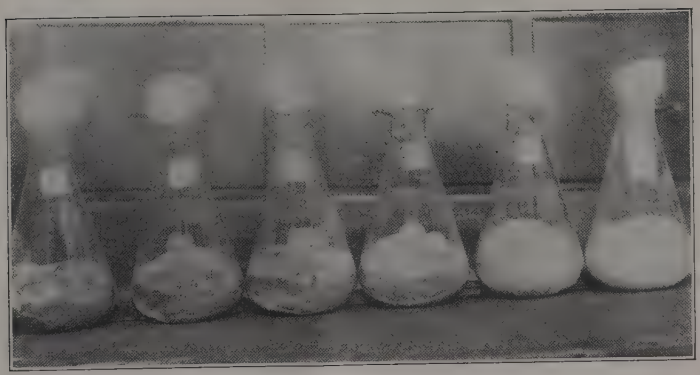


FIG. 5

FIG. 6

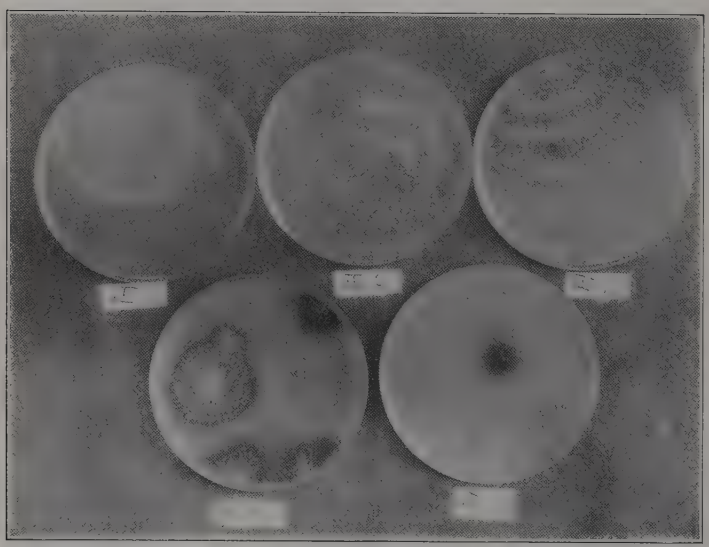
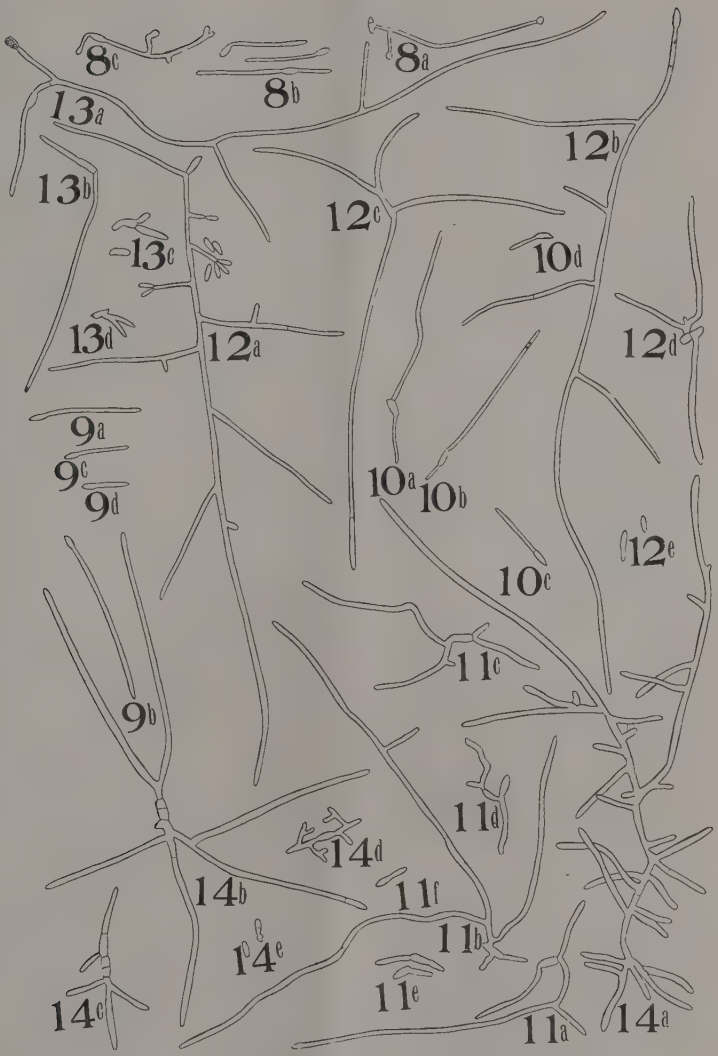
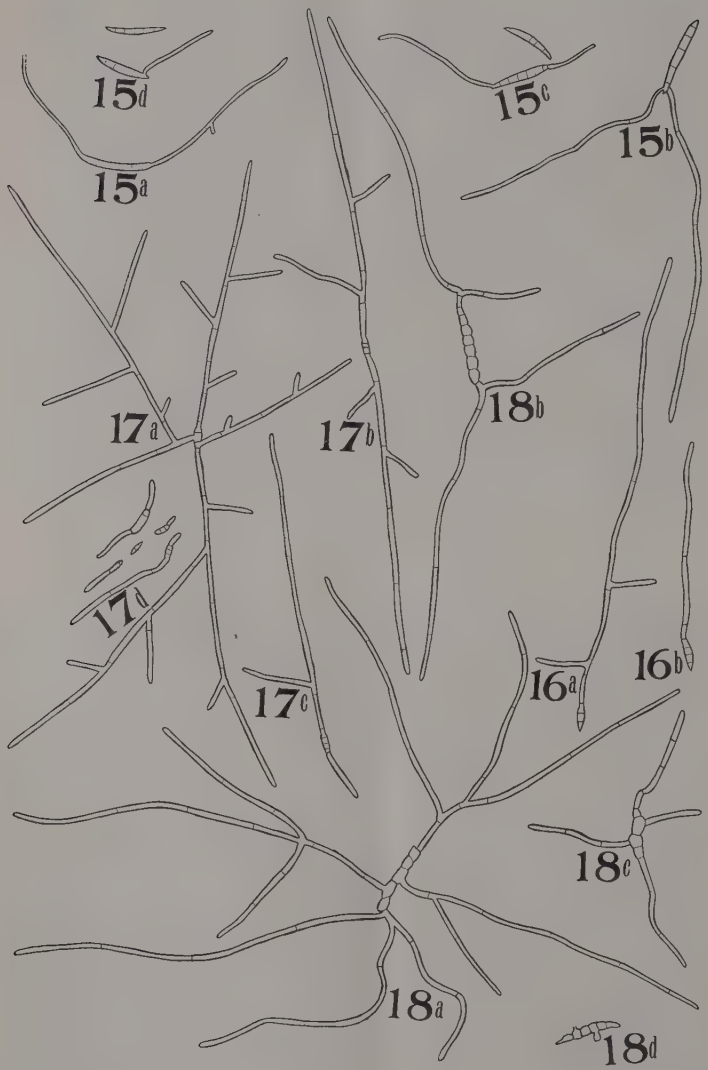
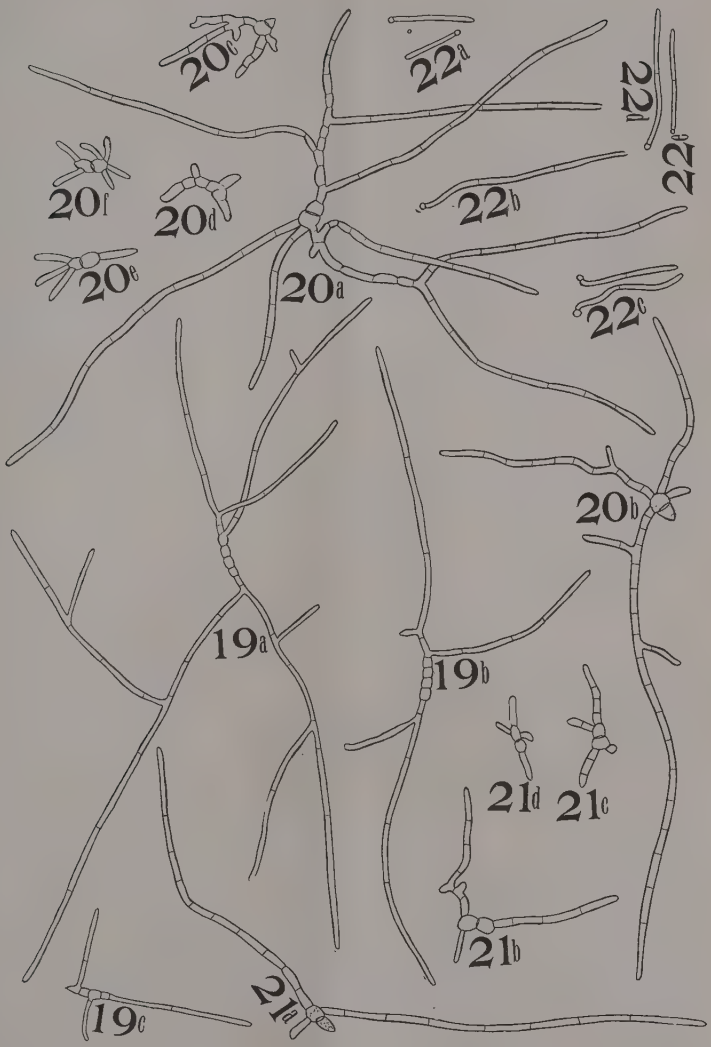
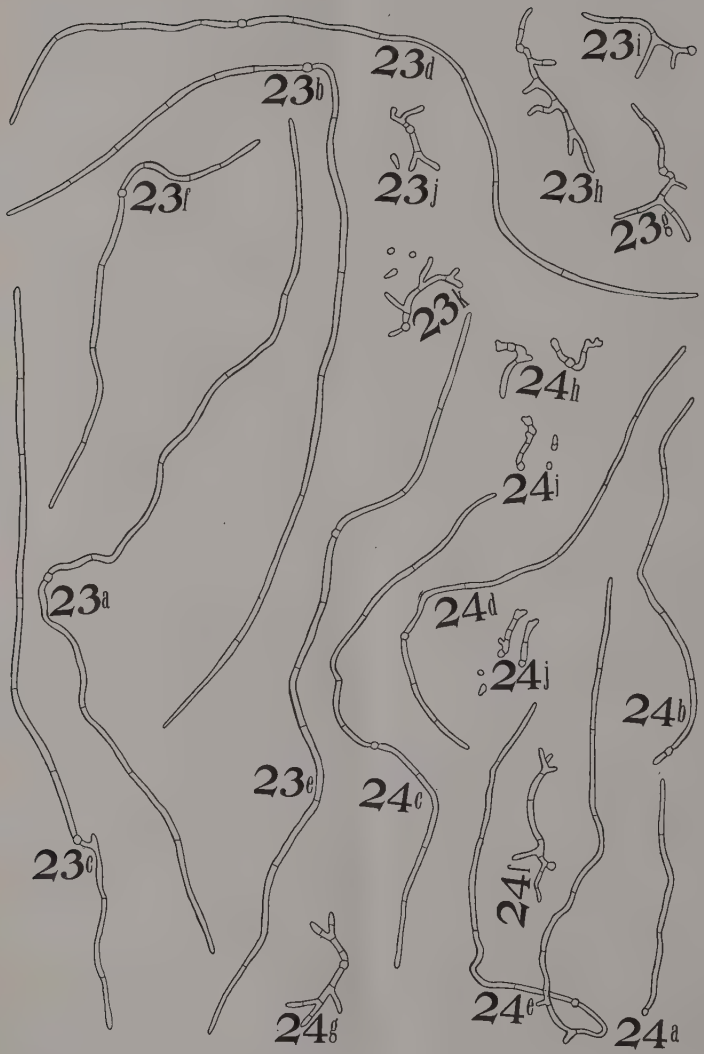


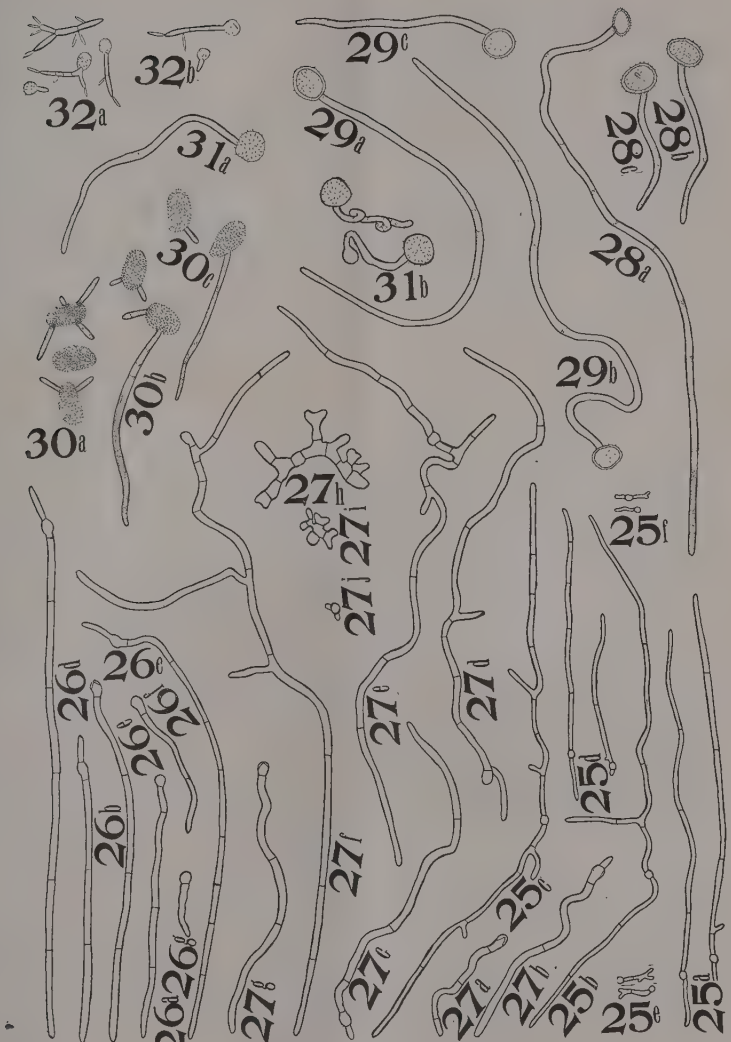
FIG. 7


8c
8b
8a
13a
12b
13b
12c
13c
10d
13d
12a
12d
9a
9c
9d
10a
10b
12e
10c
11c
9b
11d
14d
14b
11f
11b
14e
11e
14c
11a
14a

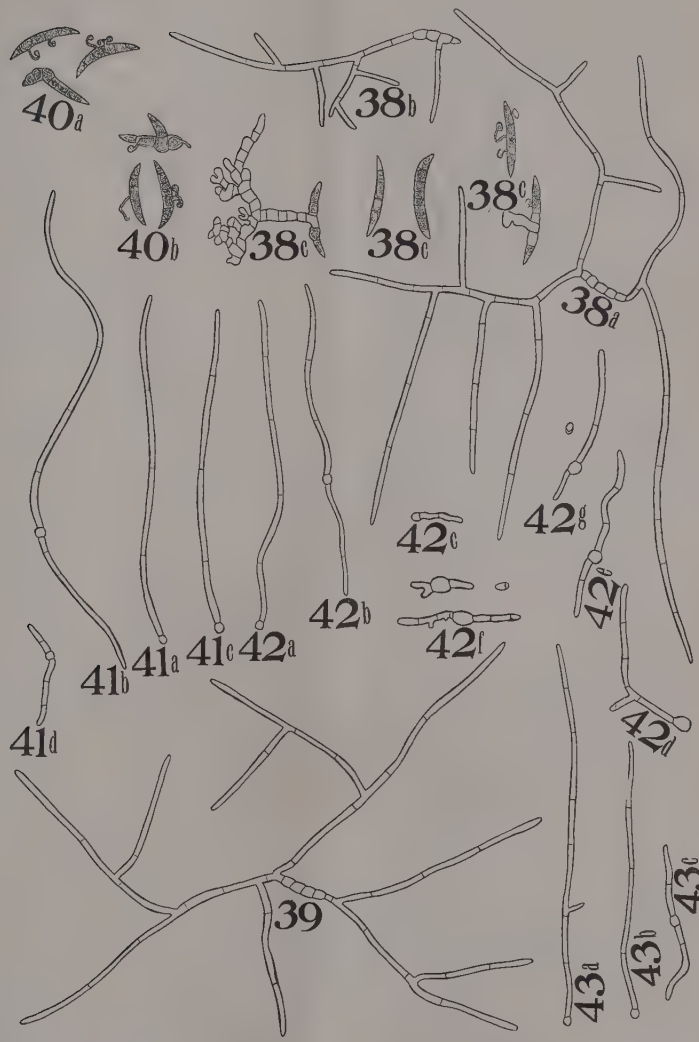

15d
15a
15c
15b
17a
17b
18b
17d
17c
16a
16b
18c
18a
18d


20c
22a
22d
22e
20f
20d
22b
20e
20a
22c
20b
19a
19b
21d
21c
21b
21a
19c


23d
23b
23i
23j
23h
23f
23g
23k
24h
24i
23a
24d
24j
24b
23e
24c
23c
24f
24e
24g
24a


32a
32b
29c
29a
31a
28c
28b
30c
31b
28a
30b
29b
30a
27h
27i
27j
25f
26d
26e
26f
26e
27e
27d
25d
26b
27f
25c
26a
26g
27g
27c
27a
27b
25b
25e
25a

37b
37a
37c
34c
34d
34a
35a
34b
35b
36c
36a
33a
33b
36b


40a
38b
40b
38c
38c
38c
38a
42g
42c
42e
42b
42f
41b
41a
41c
42a
41d
42d
39
43a
43b
43c

[Reprinted from the Plant World, Vol. 13, No. 1.]

AN INTERESTING MARASMIUS FAIRY RING

By Howard S. Reed

AN INTERESTING MARASMIUS FAIRY RING.

By Howard S. Reed.

The accompanying illustration shows a distinct "fairy ring" formed by *Marasmius caryophylleus* (Schaeff.) Schroet. (*M. Oreades*), observed by the writer in September. This fairy ring was found in a small grove of hemlock (*Tsuga Canadensis*) on the campus of the Virginia Polytechnic Institute. As shown in the illustration, the ring was approximately centered around one of the hemlock trees located in the densest part of the grove. On the left of the tree, where the ground was several inches lower, the ring was interrupted by several wide distances

Fig. 6. Fairy ring centered around a hemlock tree

in which no fungi appeared. Nevertheless the ring could be quite distinctly traced around the tree.

This very definite arrangement of the fairy ring with reference to the tree suggests some interesting questions regarding the probability of mutual action between the two. The surface of the soil was everywhere covered with fallen needles from the hemlock, and therefore equally subject to the action of the terpenes which they might contain or other organic compounds,

arising from the decomposition of the needles. The soil is, however, subject to the action of compounds brought down by the rain-water, which trickles off the trunk of the tree and comes to the soil close to the foot of the tree. It is well known that hemlock bark contains large amounts of tannin, for which it is valuable as an article of commerce. It seems quite certain that the rain-water trickling off would bring to the soil greater or less quantities of this substance, which is known to act deleteriously upon vegetation. Livingston * has shown that the rain-water gathered from oak and chestnut trees had a deleterious influence upon wheat seedlings and the author * * has previously published an instance of the deleterious action of a Kentucky coffee tree upon ornamental plants growing about its base.

In the present instance it is evident that the poorest growth of the fungi is on the lower side of the area, where any excess of water which does not percolate into the soil would flow over its surface, and during long, heavy rains this has been noted actually to occur.

The possibility of a mycorrizal association was not investigated, although in view of the recent work of Pennington and others such * an association might exist; but it is not quite plain why the fungi should grow in a definite ring if this were the only biological factor determining the relationship.

Virginia Polytechnic Institute.

*Bull. 36, Bureau of Soils, U. S. Dept. of Agr., 1907.

**Plant World, 12:279, 1907.

Abdruck aus dem
Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten.
II. Abteilung.
Herausgeg. von Dr. O. Uhlworm in Berlin. — Verlag von Gustav Fischer in Jena.
IX. Band. 1902. No. 11/12.

Nachdruck verboten.

Zur Biochemie der Holzpilze.

Von Ingenieur **Josef Schorstein,** Wien.

In Verfolgung bautechnischer Zwecke nahm ich mit verschiedenen Holzstücken künstliche Infektionen mit Hymenomycetenkulturen vor, um durch das ungleiche Verhalten von Holzstücken der gleichen Baumart gegenüber den Angriffen dieser Pilze die Bonität der ersteren, bezw. deren Widerstandsfähigkeit konstatieren zu können.

Nach stattgefundener Invasion der Hyphen in die Holzkörper bemühte ich mich lange vergebens, mittels des Polarisationsmikroskopes die durch die Pilzenzyme hervorgerufene Aenderung des Chemismus der Substrate nachzuweisen.

Ich glaubte, mit Rücksicht auf die von R. Hartig oft konstatierte Beobachtung, daß manche verpilzte Hölzer, mikrochemisch behandelt, stellenweise „Cellulosereaktion" zeigen — durch das anisotrope Verhalten des Dextrosans solche Unterschiede wahrnehmen zu können. Allein dieselben ließen sich weder bei künstlich verpilzten noch bei natürlich verfaulten Hölzern finden. Von der Ueberzeugung geleitet, daß die Lebensthätigkeit der Pilzhyphen bedeutende chemische Veränderungen im Holzkörper bewirken muß, suchte ich nun andere Mittel zur Erkennung derselben. Die Czapek'sche Entdeckung[1]), daß es Pilze giebt, die die „ätherartige Verbindung zwischen dem Hadromal und der Cellulose" spalten, und das Hadromal freimachen, so daß es durch Alkohol oder andere Lösungsmittel in größeren Mengen extrahierbar wird, wie sich durch die Phloroglucin-ClH-Reaktion in der Kälte nachweisen läßt, war für meine Zwecke aus 2 Gründen unbrauchbar. Erstens ist auch in pilzfreien Hölzern mehr oder weniger ungebundenes, durch Alkohol ausziehbares Hadromal enthalten. Zweitens macht dasselbe nur etwa 2 Proz. der gesamten Holztrockensubstanz aus, weshalb ihm die Wichtigkeit gar nicht zukommt, die es in der Litteratur infolge seiner prächtigen Farbenreaktionen noch heute, mehr aber noch vor seiner Isolierung durch Czapek, in Anspruch genommen hat, wo man es mit Vanillin, Zimmtaldehyd, Coniferin etc. verwechselte, und als sich noch eine ansehnliche Reihe von Forschern mit seiner Entlarvung befaßte.

Meine Vermutung, daß die Polarisation der alkalischen Holzextrakte Neues ergeben dürfte, bestätigte sich. Es wurden Picea excelsa, Pinus sylvestris und Fraxinus excelsior mit einem den Agaricineen angehörigen Holzpilze (der parasitische und saprophytische Fähigkeiten gleichzeitig besaß), von mir infiziert, und sodann geraspelt und mit 5-proz. (dann mit 10-proz.) Natronlauge kochend extrahiert. Nach Entfärbung der Extrakte mit Blutkohle wurden dieselben im Halbschattenpolarisationsapparate

1) Zur Biologie der holzbewohnenden Pilze. (Berichte d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. XVII. 1899.) Dann: Congrès intern. de Botanique à l'Exposition Univ. 1900. (Extr. du Compte rendu. p. 14—18) und Sitzungsber. d. D. nat.-med. V. „Lotos". 1898. No. 7. Friedr. Czapek: Zur Chemie der Holzsubstanz).

untersucht, wobei sich zeigte, daß dieselben eine optische Aktivität nicht besaßen, während jene der normalen und anatomisch äquivalenten Holzstücke, die auf ganz gleiche Weise erzeugt worden waren, eine ihrem Xylangehalte entsprechende Linksdrehung zeigten.

Es muß daher der Pilz in den ersten Tagen seiner Thätigkeit dem Holze das Xylan entzogen haben, und es dürfte diese Eigenschaft des Blätterschwamms allen Hymenomyceten zukommen.

Es braucht hier kaum erinnert zu werden[1]), daß das Holzgummi (Xylan), welches bei dieser Behandlung in Lösung geht, eine spezifische Drehung $\alpha_{(D)} = -84^0$ besitzt, in allen Hölzern vorkommt und 8—30 Proz. der gesamten Trockensubstanz ausmacht, und daß dasselbe sich annähernd glatt zu einer Pentose hydrolysieren läßt, so, daß es also als das Anhydrid einer solchen (der Xylose) somit als Pentosan aufzufassen ist. Die von Tollens angegebenen, verhältnismäßig leicht ausführbaren, quantitativen Pentosanbestimmungen[2]) ermöglichen eine rasche Kontrolle für die eben vorgebrachten Schlüsse, doch war ich bisher noch nicht in der Lage, diese Analysen durchzuführen. Dieselben wären der Polarisation, wenn genügend Zeit vorhanden ist, eigentlich vorzuziehen, da man dann von störenden optischen Eigenschaften der alkalischen Amylumlösungen unabhängig ist. Es darf auch nicht übersehen werden, daß es sowohl rechts- als auch linksdrehende Harzbestandteile giebt, die durch Natronlauge in Aktion treten.

Will man aber kürzehalber polarisieren, so befolge man den Rat Thomsen's bezüglich der Vorbehandlung der Holzspäne mit Ammoniakwasser behufs Entfernung der Farbstoffe und Eiweißverbindungen, da Entfärbungsprozeduren späterhin schwieriger sind, indem die Blutkohle ja in saurer Lösung nicht zur Anwendung kommen darf, um das Xylan nicht auszufällen.

Robert Hartig[3]) giebt für Merulius lacrymans, Polyporus vaporarius und Polyporus sulphureus an, daß dieselben das Xylan ihres Substrates nicht angreifen.

Ich hatte bisher nur Gelegenheit, Einen dieser 3 Xylophagen auf diese Eigenschaft hin zu prüfen, und kann Hartig's Behauptung bezüglich des Merulius lacrymans als unrichtig bezeichnen. Man ist nicht imstande, aus einem von Hausschwamm zerstörten Holze Xylan darzustellen, noch die Tollens'sche Pentosenreaktion[4]) nach vorgenommener Hydrolisierung mit ClH, mit Phloroglucin + ClH in der Wärme zu erzielen.

Dem Rate Professor Dr. Friedrich Czapek's folgend, beabsichtige ich jetzt, Hymenomycetenmycele auf Holzgummi[5]) und parallel auf Holzspänen zu kultivieren, um weitere Beweise für den Nährwert der Pentosane für diese Xylophagen zu gewinnen. Die Versuche haben bereits begonnen.

---

1) Conf. Tollens, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate. Bd. II. p. 201 und Thomsen, Journal f. prakt. Chemie. Bd. XIX. p. 146.
2) Journal für Landwirtschaft. Bd. XLIV. Heft 2. p. 175. Jahrg. 1896.
3) Lehrbuch der Pflanzenkrankheiten. 3. Aufl. Berlin (Springer) 1900.
4) Journal für Landwirtschaft. l. c. p. 175.
5) Aus der Fabrik von Dr. Th. Schuchardt, Görlitz.

The Development of Gnomonia erythrostoma, Pers.

The Cherry-Leaf-Scorch Disease.

BY

F. T. BROOKS, M.A.

Senior Demonstrator of Botany, Cambridge University.

With Plates XLVIII and XLIX.

IN 1886 Frank (17) gave a short account of the development of this Pyrenomycete and showed that it was the cause of an epidemic disease of Cherry trees in the district of Altenlande in Germany. The chief features of the life-history of the fungus as described by Frank may be summarized as follows:—

Infection of the leaves first takes place in the spring, and the mycelium which develops in them passes towards the base of the leaf-stalks where it prevents the formation of the absciss layer. By this means infected leaves do not fall in the autumn but remain hanging on the trees to cause infection of the new foliage in the following spring. Where the mycelium is present in the leaves, spermogonia giving rise to spermatia, and coiled structures with trichogynes, are found. Frank considers that the spermatia fertilize the coils, after which the latter develop into perithecia which liberate their spores in the spring. Frank's brief account only dealt with the grosser development of the fungus, and it was obvious that a cytological investigation was to be desired. The absence of figures of the ascogonia, trichogynes, &c., in Frank's account, and the lack of detailed knowledge of the development of the perithecium of the Pyrenomycetes generally, made this all the more imperative.

The present investigation was begun at the suggestion of Professor V. H. Blackman, to whom I am much indebted for advice and criticism.

Material was obtained from the Cherry-growing districts of Kent, where the disease caused by *Gnomonia erythrostoma* is known as the 'Cherry Leaf Scorch' on account of the appearance presented by the retained foliage of infected trees in autumn and winter. At the outset of the investigation attempts were made at Cambridge to cause infection of some of the varieties of Cherries most susceptible to this disease. For this purpose specimens of such trees were obtained, and in the spring, at the

[Annals of Botany, Vol. XXIV. No. XCV. July, 1910.]

time when the new foliage was appearing, cherry-leaves containing the ripe perithecia of the fungus—likewise obtained from Kent—were damped and hung on the trees. Frank has shown that the perithecia when alternately damped and dried liberate their spores by successive ejaculations. I confirmed this by placing damp leaves bearing perithecia in Petri dishes ; when the leaves had become dry it was found that the ascospores had collected in groups of eight on the lid of the dish. Thus when leaves bearing mature perithecia were damped and hung on the trees it was considered that the conditions approximated to those under which infection ordinarily occurred in nature. Later on in the summer it was found that a few leaves had become infected. The number of infected leaves, however, was insufficient to provide material in different stages, so several journeys were made to Kent for the purpose of obtaining further supplies. During these visits some observations were made on the relative susceptibility and immunity of different cultivated varieties of Cherry trees. It was found that the following kinds of sweet cherries are attacked by the disease to the greatest extent :—Florence, Waterloo, and Frogmore, while Elton Heart and Black Heart are only slightly attacked, and Amber, Turk, and Crown varieties are apparently immune from the disease.[1] These observations are in agreement with those of Salmon (27).

Thus the ' Cherry Leaf Scorch ' is another of those diseases which affect different cultivated varieties of the host species to very different degrees. As yet, practically nothing is known as to the factors which confer immunity upon some varieties.

Upon making inquiries I found that the ' Scorch ' disease is now much less prevalent in Kent than formerly. This is due to the commendable practice in many orchards of destroying from year to year the leaves found hanging on the trees in winter. It has been well known since Frank's first account of the disease, that the leaves which hang on the trees in winter are the only means by which a new infection can take place.

In one or two plantations visited, these measures had not been taken for the destruction of the disease. It was here noticeable that the trees susceptible to the disease produced only a very meagre quantity of fruit—the natural consequence of the weakening of the trees by the presence of the fungus for several years—and the cherries that were formed became hard, distorted, and spotted. Such cherries never became properly ripe.

External Appearance of Leaves affected by the Parasite in its Early Stages of Development.

Great difficulty was experienced at first in finding leaves in the early stages of attack. Little help was obtainable from Frank's account as

[1] Acid cherries also remain free from attack.

he describes the external features of the disease with extreme brevity. After considerable trouble, however, I was able to find Cherry leaves which contained the parasite in the very young stages of development. The first signs of disease are the presence of faint yellowish patches either on the margin or near the midrib of the leaves, though when these patches are seen for the first time they hardly suggest disease of a serious nature.

On cutting hand sections through leaves affected in this way the characteristic mycelium of *Gnomonia erythrostoma* could be discerned. These yellowish patches are first recognizable in the early part of July. They increase in size and become more clearly yellow in colour. Towards the end of August spermogonia become visible. They are formed in enormous numbers, and appear externally as tiny circular spots on the under surface of the yellowing parts of the leaves and just visible to the naked eye. With the production of spermogonia the diseased portion of the leaf becomes brown.

Methods.

Portions of diseased cherry leaves were fixed in various fluids. Flemming's weaker and stronger solutions, Gilson's fluid, Juel's fluid, and acetic alcohol were tried, but as the first-named solution proved to be by far the most satisfactory fixative it was generally used. An air-pump to aid fixation was employed when necessary. The material was cleared in chloroform or in cedar oil and embedded in paraffin of about 52° C. melting point. Microtome sections were cut from 5 μ–15 μ in thickness and were stained either in gentian violet and orange G, or in Heidenhain's iron-alum-haematoxylin, with a counter-stain of orange G, congo red, or erythrosin.

Vegetative Mycelium.

Frank (17) states that the ascospore on germinating upon the surface of the leaf gives rise to an appressorium, a structure which doubtless performs mainly an anchoring function. The appressorium puts out a short tube which penetrates the cuticle directly, thus entering an epidermal cell. The parasite enters the intercellular spaces of the mesophyll by means of another short hypha which penetrates the inner wall of the epidermal cell. Evidence of the production of appressoria and of the penetration of epidermal cells was also seen in my preparations of the young mycelium.

The subsequent development of the mycelium is intercellular. A general view of it is seen in Plate XLVIII, Fig. 1. The mycelium consists of broad hyphae which are septate and branch at intervals ; it ramifies most abundantly in the spongy parenchyma, but not infrequently branches are put out which force their way between the closely packed palisade cells. Narrowings

of the hyphae occur frequently when they intrude between the host cells. It is often observed that cells of the parasite are very closely attached to cells of the host. In such cases it appears that the wall of the fungus cell becomes somewhat gelatinized so that the contact can be more intimate. Haustoria, however, were never seen. After a time the host cells, which are in intimate contact with the fungus, shrivel and die. Such disorganization of the host cells is seen particularly well where a branch of the general mycelium penetrates the palisade region of the leaf. It is obvious that the fungus kills the host cells gradually. On the other hand, the parasite does not remain in intimate connexion with living cells of the host over such a long period of time as is the case with Rust Fungi, where, of course, haustoria are developed. The chlorophyll granules of the cells of the Cherry leaves in the neighbourhood of the mycelium are smaller in size than granules in healthy parts, and they are yellowish in colour.

On cutting hand sections of fresh material, it is seen that the hyphae of the parasite are filled with extremely granular protoplasm. In stained preparations the cells are found to be multinucleate, as will be seen by an examination of Fig. 1. Some cells contain as many as fifteen nuclei, but the general number is from five to eight. The multinucleate nature of the cells of this fungus is thus the same as that found in *Humaria granulata* (3), *Aspergillus herbariorum* (20), and many other Ascomycetes, though different from the uninucleate condition of the cells in the Mildews (22). It is very doubtful, however, whether any phylogenetic significance is to be attributed to the uninucleate or multinucleate nature of vegetative cells in the Ascomycetes.

The nuclei of *Gnomonia erythrostoma* are small, but, in spite of this, they show a fair amount of structural detail—much more in fact than the vegetative nuclei of many other fungi as yet examined. The vegetative nucleus contains several small, deeply staining, granules found generally near the nuclear membrane, and in some cases a distinct though faint reticulum can be seen (Fig. 2); a nucleolus may or may not be present. In many other fungi (e. g. the Rusts), the only portion of the vegetative nucleus which takes up the stain with ease is the nucleolus, so that, apart from the latter, the nucleus appears homogenous.

Apart from the divisions in the ascus and ascospore to be described later, the nuclei have been only rarely seen undergoing the process of division, and in these cases details could not be made out.

After the mycelium has ramified in the leaves for some weeks, spermogonia and the coiled structures (Knäuel verflochtener Fäden) described by Frank are formed. Although the two sets of structures overlap in development, some spermogonia always appear first.

The Spermogonia.

These are produced in enormous numbers on the under surface of the affected leaf-areas. Their external appearance has been already described. Occasionally two spermogonia coalesce to form a compound structure. The wall of the spermogonium consists of very closely compacted hyphae which form a kind of pseudoparenchyma. From the interior of the spermogonium, hyphae grow out towards the small circular orifice. These hyphae even at the base are much narrower than the vegetative hyphae, and they quickly taper to a point. The spermatia are formed by abstriction from the extremities of these hyphae. A general view of a section through a spermogonium is seen in Fig. 3, a portion of which is shown on a more highly magnified scale in Fig. 4. The cells which give rise to spermatia are uninucleate, the single nuclei being larger and showing a more clearly defined network than the vegetative nuclei. The hyphae from which the spermatia originate, are often unbranched, though sometimes branching may occur as seen in Fig. 4. There is some evidence that more than one spermatium can be abstricted successively from the apical region of the spermogonial hyphae. In a mature spermogonium a few hyphae are seen to be distinguished from those giving rise to spermatia by growing further towards the orifice, and by their more deeply staining character. It is likely that these hyphae aid in the extrusion of the spermatia.

The material was not favourable for observing details of the nuclear division which occurs prior to the abstriction of a spermatium. After this division, the daughter-nucleus which will become the nucleus of the spermatium rapidly becomes elongated. After separation of the spermatium from the hypha, the nucleus of the former is long and thread-like, and occupies a large part of the space within the wall. A relatively small amount of cytoplasm is present, most of which is found towards the lower end of the spermatium (Fig. 6). Under high magnifications the thread-like nucleus is seen to be not quite homogeneous, some portions staining more deeply than other (Fig. 6).

The spermatia are straight at the time of formation, but most of them become curved to different degrees upon liberation from the spermogonium. Fig. 5 shows the diversity of form assumed by the spermatia. Sometimes the spermatium has the hooked shape of the spermatium of *Polystigma rubrum* (15), but more often the amount of curvature is only slight. The spermatia are from 8 μ–18 μ in length by about 0·5 μ broad. Frank gives the length of the spermatia as 14 μ–16 μ, but my experience is that the diversity in length is much greater than this. They are very slightly broader at one extremity than at the other, but the difference in this respect is much less marked than is the case with the spermatia of *Polystigma rubrum*.

A very large number of spermatia are produced within a spermogonium. They extrude from the orifice in a short coiled thread. The pycnidia of many other Pyrenomycetes (e. g. *Valsa*) and of certain members of the Sphaeropsidales (e. g. *Cytosporina*) liberate their spores in the same way, but whereas the coiled thread in these cases is frequently as long as 7 mm., the thread in *Gnomonia* is less than a millimetre in length. When one of these threads of spermatia is put into a drop of water it becomes broken up into the innumerable spermatia of which it is composed. Doubtless in nature spermatia are scattered over the under surface of the affected area of the leaf by the action of rain or dew.

Spermatia have been frequently seen adhering to the trichogynes whose structure will be described later (cf. Figs. 7, 8). It may be said here, however, that the trichogynes pass out of the stomata in compact groups of two to five. In most cases observed, not one, but several, spermatia were found to be attached to one group of trichogynes. When one considers the enormous numbers of spermatia produced and the close proximity of the gelatinous trichogynes to the spermogenia, one recognizes that it is difficult for the trichogynes to escape having spermatia adhering to them.

A large number of sections prepared during two successive years have been examined, but no definite evidence has been obtained for the passage of spermatial nuclei down the trichogynes. Occasionally what appear to be spermatial nuclei are seen embedded in the disorganizing matrix of the trichogynes and even at some considerable distance from their extremities. It is, however, a matter of great difficulty to be certain of the identity of such bodies at this stage because the degenerating nuclei of the trichogynes become elongated and, when stained, simulate the spermatial nuclei themselves.

Attempts have been made to induce the spermatia to germinate, but without success. After prolonged immersion in water and various nutritive solutions they did not show the least indication of further development. Indirect evidence as to the lack of germinative power possessed by these spermatia is obtained from the circumstance that no newly infected areas appear on the leaves after spermogonial formation. Of course one must not lay too much stress upon the apparent inability of these spermatia to germinate, because it is well known that the spores of many parasitic fungi are often erratic in their germinative capacity.

Upon considering the above data one is compelled, I think, to conclude that the spermatia of *Gnomonia erythrostoma* are abortive structures of the nature of male cells. Frank (17) came to the conclusion that they were male cells chiefly upon the ground that he had seen them attached to the trichogynes. The above account of their cytological characters and other facts cited in regard to them demonstrate more clearly what their nature is. V. H. Blackman (1) has shown that the spermatia of the Uredineae possess

the cytological characteristics of male cells—viz. a relatively large nucleus, a small amount of cytoplasm, and absence of food-reserves. The cytological features of the spermatia of *Gnomonia* are identical with these. One can also point to the striking similarity in general structure between the spermogonia of *Gnomonia* and those of the Uredineae. The fact that no success has attended one's efforts to induce the spermatia of *Gnomonia* to germinate is in keeping with the inability exhibited by the spermatia of the Uredineae to undergo further development under all conditions approximately normal.

In this connexion it is interesting to compare the cytological characters of the pycnidiospores of a species of *Phyllosticta* frequently found associated with *Gnomonia* on old Cherry leaves. *Phyllosticta* is a genus belonging to the Sphaeropsidales. The pycnidiospores of this genus readily germinate. Fig. 6*a* shows some of stained spores of the species of *Phyllosticta* found on old Cherry leaves. It will be observed that the relation between the size of the nucleus and the amount of cytoplasm is radically different from that holding in the spermatium of *Gnomonia*.

The fact that in *Gnomonia* some spermogonia are always produced before the formation of the coiled structures (to be described later) is what one would expect if the spermatia at present or in the course of recent phylogeny performed a fertilizing function. In the Rusts, too, one finds that the formation of spermogonia precedes that of aecidia.

Some authorities, e. g. Brefeld (4) and Christman (5), hold that the spermatia of the Uredineae are simply asexual spores which have lost the power to germinate; but their cytological characteristics, as first demonstrated by Blackman, seem to negative this view.

Trichogynes and Ascogonia.

Soon after the beginning of the formation of spermogonia, groups of hyphae towards the lower epidermis begin to entwine themselves closely together and so form the 'coils' (i. e. the 'Knäuel verflochtener Fäden' of Frank) which are the earliest stages of perithecial development (Fig. 8). The hyphae which become compacted into these 'coils' cannot be distinguished from vegetative hyphae. The 'coils' are roughly spherical in shape, but they differ much in size, their diameter varying from 40 μ–100 μ. It is generally found that certain hyphae connected with the periphery of the 'coils' pass out through a stoma. These hyphae, the trichogynes of Frank (17), are most often grouped together in a compact bundle of two to five which protrudes slightly from the stoma. The trichogynes passing through any one stoma are closely compacted together in the apical region (Figs. 7, 8). The group becomes somewhat narrowed while passing through the stoma, but when clear of it expands again and terminates as a dome-shaped mass (Fig. 7). The cell walls at the tips of the trichogynes become

swollen and apparently mucilaginous, as do also the lower lateral walls to a lesser extent.

The tufts of trichogynes are generally placed laterally in relation to the 'coils'. Thus it is rare to see a group of trichogynes over the middle of a 'coil'. It is often evident that at least two series of trichogynes are associated with a single 'coil', but only very rarely are two such groups seen in a single section. In all cases examined it was only possible to trace a connexion between the trichogynes and the outermost cells of the 'coil'. The trichogynes could never be traced to any structures resembling ascogonia, so must therefore be looked upon as mere continuations of ordinary vegetative hyphae belonging to the 'coil'. Fisch (15) and Frank (16) state that in *Polystigma rubrum* the trichogyne is the termination of a clearly differentiated archicarp. In this respect, therefore, *Gnomonia* differs considerably from *Polystigma*.

The apical cell of each trichogyne is long and narrow, and generally contains a single nucleus (Fig. 11); occasionally a second nucleus is present. The first septum below the extremity of the trichogyne is approximately at the level of the inner wall of the epidermal cells, and below this region the identity of the trichogyne is lost, so that as a well-marked structure it is only one cell in length. It may be pointed out that the uninucleate condition of the apical cell of the trichogyne is the same as that found by Baur (*a*) in the corresponding structure of *Collema*, and by Darbishire (12) in *Physcia*. On the other hand, all the cells of the hyphae beneath the terminal cells of the trichogyne are multinucleate and, as has already been said, are scarcely distinguishable at the time of their formation from cells of the general mycelium.

At a later stage a few cells in the midst of the 'coil' become differentiated from those around by their larger size, their denser protoplasm, and by their larger and less numerous nuclei (Figs. 9, 10, 11, 14). Though these cells often appear to be isolated from each other in a single section they really belong to one or more twisted filaments, as is ascertained by examining successive sections. No pores such as occur in the archicarps of *Ascobolus* (32) and *Ascophanus* (7) have been observed between the contiguous cells of these filaments.

The nuclei of these special cells usually possess a distinct nucleolus, but no reticulum is visible, while the nuclei of the cells around contain several small chromatin granules and the nucleolus when present is very small. Furthermore, they are about twice the size of the vegetative nuclei. Nuclei of an intermediate character are sometimes visible in the larger cells in the centre of the 'coil'. Occasionally one or two exceptionally large nuclei are found in these differentiated cells. Such nuclei contain several deeply staining chromatin granules, but no well-marked nucleolus (cf. Fig. 11). It may be that these nuclei have grown immensely in size prior to division, but on the other hand they may be hypertrophied.

It is considered that the nuclei present in the differentiated part of the 'coil' have become larger in size by a process of growth, no fusion having been observed before their occurrence. By comparison with certain Lichens and with *Polystigma* these larger cells in the midst of the 'coil' are to be interpreted as ascogonial cells, while the surrounding cells are purely nutritive and protective in function. On the other hand the ascogonial cells are not so clearly defined in *Gnomonia* as in the Lichens and in *Polystigma*. There can be no doubt that in *Gnomonia* more than one ascogonium is usually present in the 'coil', which later gives rise to a single perithecium; while in *Polystigma*, according to Fisch and Frank, the perithecium generally develops in association with a single ascogonium.

It has already been mentioned that spermatia in considerable numbers have been seen attached to the trichogynes. No evidence was obtained that the nucleus of a spermatium fused with the single nucleus usually present in the terminal cell of a trichogyne, or that it passed downwards to the larger ascogonial cells. In fact the single nucleus of the apical part of the trichogyne often shows signs of disorganization as soon as the trichogyne has passed beyond the stoma, and this unhealthy condition frequently extends to several of the nuclei in the cells immediately below. Frank states in his account of *Polystigma rubrum* that where spermatia adhered to the trichogynes the former seemed to be poorer in contents. He concluded from this that the nuclei of the spermatia passed into the trichogynes and performed a fertilizing function. It would appear, however, that the apparent diminution of protoplasmic contents might be just as readily explained by the process of disorganization which the spermatia would naturally undergo if they remained for any length of time on the exposed trichogynes. It is clear that the mere adhesion of spermatia to the trichogynes is no evidence for their fertilizing function.

During this investigation of *Gnomonia*, coils, apparently normal, have been frequently seen, to the trichogynes of which no spermatia were adhering. A more surprising phenomenon has been observed in that the trichogynes sometimes grow out from small groups of hyphae in which no ascogonia can be seen, and which therefore cannot be considered to be of the same nature as the 'coils'. Trichogynes have also been seen growing from ordinary hyphae which were not massed together (Fig. 12). Frank also mentions this fact, but appears to attach no significance to it. The nuclei of the cells in immediate connexion with such trichogynes are in no way different from ordinary vegetative nuclei. It was not only in material gathered early in the season that trichogynes were found apart from the 'coils', but that obtained much later showed the same phenomenon. Hence the view that the vegetative cells below these trichogynes develop later into 'coils' cannot be entertained.

I observed also a group of trichogynes in connexion with the margin

of a spermogonium. In addition to this anomalous behaviour, trichogynes have also been seen undergoing further development as vegetative hyphae (Fig. 13). Such behaviour of the trichogynes militates strongly against the view that they are functional receptive organs. The question of their present function will be considered later.

Careful search was made amongst the ascogonial cells of the 'coil' to see if there was any fusion of nuclei in pairs similar to that which takes place in the ascogonium of *Humaria granulata* described by Blackman and Fraser (3), or in the more similar multicellular ascogonium of *Ascophanus carneus* recently described by Cutting (7). No such process, however, was observed.

The 'coils' may develop into perithecia in the autumn or may remain throughout the winter in the same condition. Fig. 15 shows a section through a portion of a 'coil' in the resting stage. It will be noticed here that two types of cells are present, viz. those with dense cytoplasm and large nuclei, and those with highly vacuolate protoplasm and smaller nuclei. I conclude that the former are the cells previously described as being ascogonial in nature. Fig. 16 also represents a section of a 'coil' in the resting condition.

The Development of the Perithecium.

Frank states that the perithecia develop from the 'coils' in the autumn, though he suggests that the asci do not ripen until later. My experience has been, however, that there is no one definite time for the development of the perithecia from the 'coils'. The change of 'coils' into perithecia has been found to occur as early as November, while in other cases resting coils have been seen as late as March.

The first thing to be observed in the further development of the 'coil' is the growth of cells in the lower middle part, i. e. the region which is remote from the trichogynes. The cells in this position send out branches which grow towards the lower epidermis of the leaf. A few of the cells above are often seen to be disorganizing. About the same time the cells towards the periphery of the 'coil' increase in number, thicken their walls, and thus become differentiated at an early stage to form the wall of the perithecium. These cells contain food reserves which are probably of an oily nature, since they blacken with Flemming's fixative; the protoplasmic contents, however, of these cells are poor. A cavity has by this time appeared towards the upper part of the developing perithecium. This is formed probably as the result in the main of the greater expansion of the outer tissues.

It is a matter of great difficulty at this stage to trace the remains of the ascogonia. Only occasionally does one find at the periphery of the perithecium an unusually large cell containing nuclei of about the same size

and general appearance as those described above in ascogonial cells. The difficulty of tracing the ascogonium at this period arises from the fact that in *Gnomonia* it is such a poorly differentiated structure. In spite of prolonged search no evidence could be obtained for the development of asci from ascogonia, and in fact after this stage the latter cannot be traced at all. It would seem, therefore, that in *Gnomonia* the ascogonial cells are no longer functional. Fisch (15) states that in the allied fungus *Xylaria polymorpha* the ascogonial cells disorganize during the young stages of perithecial development, and that the ascogenous hyphae arise *de novo*. Traces of functionless ascogonia have also been found in *Otidea aurantia* (20 *a*) and in certain Lichens.

The branches previously put out from the lower middle part of the ascocarp continue their growth towards the region which later becomes the neck of the perithecium. These branches vary considerably in width, but usually they are nearly as broad as the asci which are formed later. They are occasionally septate and are of irregular growth (Fig. 17). Their cells are poor in cytoplasm, and their nuclei are not to be distinguished from the usual vegetative nuclei. These threads disorganize before the asci come to maturity. The width, the irregular growth, and the early disorganization of these threads all indicate that they cannot be looked upon as typical paraphyses. In fact, *Gnomonia erythrostoma* has no ordinary paraphyses when the asci are mature. The appearance of these outgrowths is striking, and at first sight they suggest asci which have developed abnormally; their function is obscure, although they may take a part in the formation of the cavity of the perithecium. They do not appear to have been described elsewhere.

At a later stage, short hyphae with dense cytoplasm and several deeply staining nuclei become distinguishable towards the base of the perithecium (Plates XLVIII and XLIX, Figs. 18, 19). The asci invariably take their origin from these hyphae. Though it was difficult to obtain certainty in the matter, close investigation pointed strongly to the conclusion that these ascogenous hyphae grow out directly from vegetative cells at the base of the perithecium. Such a development is the natural corollary of the disappearance of the ascogonia in earlier stages. In the process of differentiation of the ascogenous cells from vegetative cells the cytoplasm becomes denser; the nuclei become larger, and contain a more definite chromatin network and also a distinct nucleolus. No fusion has been observed prior to the formation of these clearly differentiated nuclei.

The gradual increase in size of the nuclei in these ascogenous cells would thus appear to be due to a process of growth alone. Fig. 18 shows some of these nuclei which are becoming differentiated from ordinary nuclei.

Sometimes the larger nuclei of these ascogenous cells are arranged irregularly in relation to each other, but more often they appear to be

associated in pairs (Figs. 20, 22). This state possibly indicates a conjugate condition of these nuclei, but in the absence of preparations showing nuclear divisions at this stage—apart from one doubtful case (Fig. 21), it is impossible to speak with certainty. In this doubtful case the difficulty of determining the connexion of the cell in which it occurs prevents one from deciding whether this conjugate division is the one immediately before the formation of the young ascus or one at an earlier stage. The cells that contain the larger nuclei branch, and so the number of ascogenous cells is increased. Fig. 22 shows this branching. The ascogenous cells cannot be traced very far because of the intricate way in which all structures at the base of the perithecium are interwoven. Hence to follow the course of the ascogenous hyphae in *Gnomonia* is a more difficult matter than in Discomycetes generally.

There is a considerable difference in regard to the manner in which the asci arise from the ascogenous cells. Crosier formation, so frequently described for other Ascomycetes, has been seen in *Gnomonia* also (Fig. 25). Often, however, although the end of the ascogenous cell begins to bend over, this process is not continued, and the terminal part, containing two nuclei which fuse, forms the ascus. Sometimes there is not even a trace of bending over (Figs. 22, 23) before ascus formation. In Fig. 22 it is evident that the penultimate cell grows out laterally to form another ascus. The same process may no doubt go on indefinitely. This mode of ascus formation is similar to that described by Maire (26 *a*) in *Galactinia succosa*. Faull (14) has also pointed out the differences to be observed in the mode of ascus formation in other Ascomycetes.

The two nuclei present in the young ascus cell lie in contact with each other and soon fuse together (Fig. 27). They seem to melt into each other. The nucleoli, however, do not become united for some time. Immediately after fusion, the nucleus thus formed increases in size and the ascus grows in length.

It should be mentioned here that while the first asci have been in process of formation, the neck of the perithecium has been differentiated by the outgrowth of cells which originally formed the part of the coil towards the trichogynes. The periphyses develop as narrow outgrowths from cells on the inside of the upper part of the ascocarp. As stated earlier, no typical paraphyses are developed.

The Cytology of the Ascus.

When the ascus nucleus has reached its maximum size, i. e. shortly after fusion has taken place, the chromatin thread becomes densely aggregated towards one side of the nuclear membrane (Fig. 28). At a later stage the thread becomes looser and more generally distributed. It has been

often observed that the chromatin network is not readily stainable at this stage (Fig. 29). This condition apparently persists for some time. The exact method of formation of the chromosomes of the first division could not be made out. No indications of loop formation have as yet been observed. Fig. 30 shows one of the few stages seen in the formation of the chromosomes. It will be observed that four lumpy masses are being elaborated within the nuclear area. Spindle formation takes place in the same manner as that described by Harper (24) and Fraser (19) in other Ascomycetes. Distinct centrosomes of a discoid shape are present at the two extremities of the spindle (Fig. 33). While the chromosomes are in process of formation the nucleolus becomes vacuolate (Fig. 30), and the nuclear membrane less clearly defined. Figs. 31–33 show the metaphase of the first division. In some cases the shape of the chromosomes of this division is strikingly like that of the heterotype chromosomes of pollen mother-cells (Fig. 34). They are short and thick, and in metaphase show a middle portion projecting equatorially and two limbs directed along the spindle. Fig. 35 shows a late stage in the first division. This nuclear division is therefore to be interpreted as being one of reduction, though whether it is heterotypic or brachymeiotic one cannot say with certainty, since the exact details of chromosome-formation have not been ascertained. The shape of the chromosomes and the fact that the second division follows rapidly upon the first furnish analogies with meiosis rather than with brachymeiosis.

In the reconstruction of the two daughter-nuclei a distinct nucleolus is formed (Fig. 36). Preparations showing the metaphase and anaphase of the second division have not yet been obtained, but the telophase is represented in Figs. 38, 39.

The four nuclei thus formed rest for some time before undergoing the next division. The chromatin network of these nuclei is clearly marked. The nuclei often show a certain amount of polarity at this stage and a little later. Thus in Fig. 40 one nucleus shows the attachment of the chromatin net to one end of the nuclear membrane. Such a condition reminds one of the ascus nuclei of *Phyllactinia*, where Harper found very distinct polarity. A slight polarity has also been seen in the bi-nucleate stage of the ascus of *Gnomonia*. No clear contraction of the chromatin network, such as has been described as occurring in some cases in connexion with brachymeiosis, was seen in the prophase of the third division nor indeed at any stage subsequent to the first division. In the third division, the spindle is generally orientated at right angles to the long axis of the ascus, but not invariably so. During the metaphase of this division the chromosomes are arranged on the equatorial plane of the spindle in the manner usual in karyokinesis (Fig. 42). The anaphase is represented in Fig. 43, and the telophase in Fig. 44. In reference to Fig. 43 it should be stated that the preparation was made from material which had been lying damp in the laboratory for some days, whereas

most of the other preparations have been obtained from material fixed directly upon arrival at Cambridge. There is no reason, however, for thinking that this preparation represents an abnormality.

From an examination of these figures there would appear to be no reduction in number of chromosomes at this stage such as there is in the brachymeiotic phases described by Miss Fraser in *Humaria rutilans* and by Miss Fraser and Miss Welsford in *Otidea aurantia*, &c.

The number of chromosomes appears to be usually four after the contraction of the first division. This number certainly seems to fit the phenomena observed better than any other number or numbers. On the other hand, there seems to be some evidence—not very definite as yet it is true, that the chromosome number in *Gnomonia* is not strictly constant. Still the preparations necessitate the consideration of this view. Furthermore, the shape of the chromosomes would appear to be variable in this fungus. Without considering the chromosomes of the first division, one has seen that they are sometimes long and thread-like, and at other times short and thick. In addition the extraordinary power of increase in size possessed by the nuclei is worthy of mention.

After the reconstruction of the eight nuclei each puts out a beak-like process similar to that described by Harper in *Lachnea seutellata* and other Ascomycetes. The astray rays become more conspicuous and bend down towards the other end of the nucleus. The exact mode of delimitation of the spores, however, could not be made out. A certain amount of epiplasm is left as in other Ascomycetes. After the spore membrane has been laid down, the nucleus undergoes a period of rest subsequent to which another nuclear division is effected. This division usually takes place towards the base of the spore. Fig. 45 shows this division. The number of chromosomes would appear to be four at this stage also. One of the daughter nuclei thus formed passes to the extremity of the spore which is towards the base of the ascus, and a septum is laid down between the two nuclei cutting the spores into cells of unequal size (Fig. 46). The nucleus of this tail-cell gradually disorganizes. It is interesting to note in this connexion that in all experiments made upon the germination of the ascospores it was only the larger cells of the latter which put out germ-tubes. The larger cell of each ascospore contains two conspicuous oil drops at maturity.

In considering the nuclear phenomena in the ascus as a whole, one is led to the conclusion that there is a single process of reduction which is effected during the first division. There is no evidence yet that a second reduction is effected at a later stage. Nor is there any obvious pairing of chromosomes which might obscure such a process.

On the evidence yet available one cannot decide whether the first division is heterotypic or brachymeiotic in nature, though certain phenomena already mentioned would appear to favour the former interpretation.

The single process of reduction in the ascus is in harmony with the single nuclear fusion which appears to occur in this form.

General Considerations.

From the observations recorded earlier in the paper, one is led to conclude that the 'coils' develop into perithecia without undergoing any process of fertilization by means of the spermatia. It is possible, of course, that this process has been missed. Even if such a fertilization did occur, it would be extremely difficult to demonstrate, both on account of the collective grouping of the trichogynes and the intricacy of the coiled structures. In view, however, of the care which has been taken in order to obtain the earliest stages of development of the sexual organs, I do not think this process can have been missed. As has been said before, the mere adhesion of spermatia to the trichogynes is no evidence that fertilization occurs, for under the conditions of growth it would be surprising if most of the trichogynes did not have spermatia attached to them. Besides, it is difficult to imagine how the spermatia can pass down to the ascogonial cells in view of the fact that no pores appear to exist in the cell-walls between the trichogynes and the cells beneath.

The most probable view is that the spermatia were originally the agents of fertilization. Their cytological characters and other evidence in regard to their behaviour point to this conclusion. The spermogonium of *Gnomonia* is to be looked upon as a sorus of functionless male organs similar to that which is so often found in the Uredineae. Such a collection of male organs may perhaps be compared to the male conceptacles of certain Florideae (e. g. *Corallina*).

The trichogynes are looked upon as having originally functioned as receptive organs for the ascogonial cells, though my observations indicate that they do not thus function at present. Other functions have been attributed to the trichogynes which are present in certain Lichens, e. g. *Collema*, *Physcia*. Thus Van Tieghem (30) considered that the trichogynes of these Lichens were really respiratory organs. It is difficult to conceive that this was the original function of such trichogynes because there are many Lichens and innumerable Rusts, and other fungi parasitic on leaves, which at present exhibit no trace of such structures. Lindau (26), on the other hand, assumes that the trichogynes in the case of the Lichens serve a mechanical function in preparing apertures for the ascocarps which arise later. This explanation will not account for the occurrence of trichogynes in *Gnomonia* where the perithecia are not developed until after the 'coil' has undergone a prolonged resting stage. Though I consider the original function of the trichogynes was that of receptive organs, it is possible that they serve at present some secondary purpose. Thus, the production of trichogynes which have no connexion with 'coils' may be explained by their

functioning in a secondary manner as respiratory organs. One naturally supposes that as the leaf of the host becomes first yellow, and then brown, the assimilatory process dwindles, until no oxygen at all is liberated, while the evolution of carbon dioxide continues for a time. Such phenomena may very well necessitate the growth of certain hyphae through the stomata to the outside atmosphere. Vuillemin (31) records the interesting fact that in the genus *Hypostomum*, parasitic on the leaves of Conifers, structures considered by him to be analogous to trichogynes are produced, although no spermogonia are present. This also points to the possibility that the trichogynes may now perform a function which was not their original one.

This investigation leads one to look upon the ascocarp of *Gnomonia* as a structure formed in relation to one or more ascogonia in close connexion with one another. This association of two or more ascogonia before the development of the perithecium is paralleled in the Discomycetes by *Pyronema confluens* (23) in which several pairs of sexual organs co-operate to give rise to a single apothecium. Stahl (28) states also that in the Lichen genus *Physma*, several archicarps go to produce one apothecium. Many other Pyrenomycetes show the presence of definite archicarps before the formation of perithecia, but in these the female organs normally arise separately one from the other. Fisch (15) states, however, that in *Polystigma rubrum*, two ascogonia with their trichogynes may arise in close association. The ascogonia of *Gnomonia erythrostoma* seem to be more closely allied to those of *Polystigma rubrum* than to those of any other Ascomycete as yet investigated. Coiled ascogonia have been described also by Kihlmann (25) as occurring in *Melanospora parasitica*, by Miss Dawson (13) in *Poronia punctata*, and by Fisch (15) in *Xylaria polymorpha*. In *Poronia*, however, the trichogyne portion is not always present, and in *Xylaria* it is constantly absent. Fisch states, in regard to the latter, that the asci arise independently of the ascogonia as they would appear to do also in *Gnomonia*. He found that in *Claviceps purpurea* there was no trace of an ascogonium, so that in the series mentioned there is an evident reduction in the formation of the female organs. When one considers the Lichen genera *Collema* and *Physcia*, one sees some resemblance between the general form of their ascogonia and those of *Polystigma* and *Gnomonia*. These four genera are all characterized too by the production of spermogonia. The cells of the ascogonia of these Lichen genera are uninucleate as described by Baur (*a*) and Darbishire (12) respectively, a condition in marked contrast to the multinucleate nature of the ascogonial cells of *Gnomonia*. Baur states that in *Collema crispum* the successive cells of the trichogyne are clearly connected by strands of protoplasm at the time which he considers to be that of fertilization. He infers that the pores through which these strands pass enable the spermatial nucleus to pass down to one of the ascogonial nuclei below. In *Gnomonia* no such phenomenon has been observed, and the fact that the ascogonia at a later stage

can no longer be traced is against such a possibility. There is circumstantial evidence in the case of *Collema crispum* in favour of fertilization by means of spermatia, because Baur (*a*) found that of the two kinds of thallus present in this species, that which bore both spermogonia and archicarps gave rise to apothecia, whereas the thallus which did not possess spermogonia only very rarely developed the ascus fructifications. It would seem, however, that until a fusion of nuclei has been observed it is not safe to conclude that fertilization has taken place by an external means. When the pores are produced between the cells of the ascogonium of *Collema*, that structure becomes a coenogamete, and development may proceed by the fusion of nuclei in pairs as occurs in *Humaria granulata*. Another possibility is, that only one nuclear fusion, that immediately prior to the development of the ascus, occurs.

Claussen's recent work on *Pyronema confluens* (6) which, however, requires confirmation, must be taken into consideration. He considers that in this species the male and female nuclei do not actually fuse in the ascogonium but merely remain closely associated together, while in the ascogenous hyphae these paired nuclei divide in a conjugate manner, nuclear fusion only occurring just before the formation of the ascus. Blackman and Miss Fraser have, however, both pointed out that even if Claussen's work holds good for *Pyronema* a mistake in the interpretation of a first nuclear fusion in the ascogonium can scarcely have been made in the examination of the uninucleate sexual organs of the Mildews, *Sphaerotheca* (22) and *Phyllactinia* (24). Besides, so many observers have independently recorded the fusion of nuclei in pairs in multinucleate ascogonial forms, e. g. *Humaria granulata* (3), *Lachnea stercorea* (18), *Aspergillus repens* (9), *Ascophanus carneus* (7), &c., that stronger evidence than has yet been urged by Claussen (6) will be needed in order to disperse the usual view of the presence of two nuclear fusions in many forms. The process of brachymeiosis following that of meiosis discovered by Miss Fraser (19) also supports the occurrence of two nuclear fusions in the life-history of those Ascomycetes in which this process of reduction has been observed.

As has already been stated, there is no evidence that the ascogonia of *Gnomonia* are functional in that they give rise to ascogenous hyphae, the latter indeed appearing to arise by the subsequent differentiation of ordinary cells. It will be remembered that Fisch has described the degeneration of ascogonia in *Xylaria polymorpha*, so that these two Pyrenomycetes would appear to be similar in this respect. In *Claviceps* and *Pleospora*, according to Fisch and Bauke[1] respectively, the formation of female organs is entirely in abeyance.

The absence of any indications of nuclear fusion in *Gnomonia erythrostoma* until ascus development occurs induces one to entertain the view that

[1] Bauke: Zur Entwickelungsgeschichte der Ascomyceten. Bot. Zeit., 1877.

in this species only a single nuclear fusion takes place.[1] It would seem that the sexual fusion which doubtless originally occurred in the ascogonia of *Gnomonia* has been replaced by a fusion immediately before the formation of the asci. There is a slight indication that a period in which the nuclei may be conjugately arranged precedes the actual fusion. If this is really the case, the commencement of the sexual process must be looked upon as beginning with the association of nuclei in pairs, as Blackman (1) has pointed out for the Uredineae. It would be premature at present to discuss the possible means by which the transference of the sexual process might have been brought about in the course of phylogeny. Only a single process of reduction in the ascus of *Gnomonia* has been observed. This harmonizes with the single nuclear fusion which has alone been seen.

The nuclear phenomena described for *Gnomonia* seem to indicate a closer parallelism between *Gnomonia* and the Uredineae than has yet been determined for other Ascomycetes. The origin of the binucleate phase in the Uredines has been shown to take place in more than one way, and in some forms possessing deeply-seated aecidia it is possible, from the recent work of Olive,[2] that the binucleate phase originates in multinucleate cells at the base of the aecidium. If this prove to be the case, the cytological behaviour would appear to be somewhat similar to that of *Gnomonia*. Such a similarity between the nuclear phenomena of some of the Uredineae and a member of the Ascomycetes is of great interest, but in the present state of our knowledge it can hardly be made the basis for phylogenetic speculations as to the relationship of these two groups. On the other hand, the closest relationships of the Uredineae are certainly with the other Basidiomycetes. It is recognized that expressions of opinion on the phylogeny of the fungi must be highly speculative from the very nature of these organisms. Therefore one hesitates to state the possibility that the Uredineae—true Basidiomycetes as they undoubtedly now are—may have been connected with the Ascomycetes in the course of phylogeny.

Summary.

1. The vegetative mycelium consists of multinucleate cells. It is intercellular. Haustoria are not developed.

2. The spermogonia are similar in structure to those of the Uredineae. The spermatia are long and thread-like, and possess the cytological characters of male cells. They are considered to be now functionless, there being no evidence that fertilization is effected by their agency as Frank supposed.

3. The trichogynes arise in tufts of 2–5, and do not invariably arise in

[1] It is possible that an earlier fusion has been missed, though in view of the careful search made for such a process this is unlikely.

[2] Olive, E. W.: Sexual Cell Fusions and Vegetative Nuclear Divisions in the Rusts. Ann. Bot., xxii, 1908.

association with 'coils'. It is suggested that the trichogynes, though originally the receptive organs, now perform a different function, possibly a respiratory one.

4. The 'coils' are the first beginnings of perithecial development. In the centre of each 'coil' one or more slightly differentiated hyphae are found. The latter are considered to be of the nature of ascogonia. No clear connexion can be traced between the trichogynes and the ascogonia.

5. The stages in the development of the perithecium from the 'coil' are described. During these processes it is no longer possible to trace the ascogonia. The ascogenous cells appear to arise by differentiation from ordinary cells.

6. The only nuclear fusion that has been observed takes place in the young ascus.

7. The nuclear divisions in the ascus are described. Only a single process of reduction has been seen. This occurs in the first division. It is not possible to decide whether this division is heterotype or brachymeiotic, though the analogies seem to be with the former rather than the latter.

8. Thus *Gnomonia erythrostoma* would appear to be an Ascomycete in which only a single nuclear fusion and a single reduction occur normally in the life-cycle.

Botany School, Cambridge,
June, 1910.

List of Papers.

a. Baur, E. ('98): Zur Frage nach der Sexualität der Collemaceen. Ber. d. Deut. Bot. Gesell., xvi.
1. Blackman, V. H. ('04): On the Fertilisation, Alternation of Generations, and General Cytology of the Uredineae. Ann. Bot., xviii.
2. Blackman, V. H., and Fraser, H. C. I. ('05): Fertilisation in *Sphaerotheca*. Ann. Bot., xviii.
3. ——————————— ('06): On the Sexuality and Development of the Ascocarp in *Humaria granulata*. Proc. Roy. Soc., London, B. lxxvii.
4. Brefeld, O. ('72 et seq.): Untersuchungen aus dem Gesammtgebiete der Mykologie. Leipzig.
5. Christman, A. H. ('05): Sexual Reproduction in the Rusts. Bot Gaz., xxxix.
6. Claussen, P. ('07): Zur Kenntniss der Kernverhältnisse von *Pyronema confluens*. Ber. d. Deut. Bot. Gesell., xxv.
7. Cutting, E. M. ('09): The Sexuality and Development of the Ascocarp of *Ascophanus carneus*. Ann. Bot., xxiii.
8. Dale, E. ('03): Observations on the Gymnoascaceae. Ann. Bot., xvii.
9. ——— ('09): On the Morphology and Cytology of *Aspergillus repens*. Ann. Myc., vii.
10. Dangeard, P. ('94–95): La Reproduction sexuelle des Ascomycètes. Le Botaniste, iv.
11. ——————— ('04): Recherches sur le développement du Périthèce chez les Ascomycètes. Le Botaniste, ix.

12. Darbishire, O. V. ('99): Ueber die Apothecienentwickelung der Flechte *Physcia pulverulenta*. Jahr. f. wiss. Bot., xxxiv.
13. Dawson, M. ('00): On the Biology of *Poronia punctata*. Ann. Bot., xiv.
14. Faull, J. H. ('05): Development of the Ascus and Spore Formation in Ascomycetes. Proc. Boston Soc. Nat. Hist., xxxii.
15. Fisch, C. ('82): Beiträge zur Entwickelungsgeschichte einiger Ascomyceten. Bot. Zeit., xl.
16. Frank, A. B. ('83): Ueber einege neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. Ber d. Deut. Bot. Gesell., i.
17. ——— ('86): Ueber *Gnomonia erythrostoma*, die Ursache, &c. Ber. d. Deut. Bot. Gesell., iv.
18. Fraser, H. C. I. ('07): On the Sexuality and Development of the Ascocarp in *Lachnea stercorea*. Ann. Bot., xxi.
19. ——— ('08): Contributions to the Cytology of *Humaria rutilans*. Ann. Bot., xxii.
20. Fraser, H. C. I., and Chambers, H. S. ('07): The Morphology of *Aspergillus herbariorum*. Ann. Myc., v.
20*a*. Fraser, H. C. I., and Welsford, E. J. ('08): Further Contributions to the Cytology of the Ascomycetes. Ann. Bot., xxii.
21. Harper, R. A. ('95): Zur Kenntniss der Kerntheilung und Sporenbildung im Ascus. Ber. d. Deut. Bot. Gesell., xiii.
22. ——— ('95): Entwickelung des Peritheciums bei *Sphaerotheca Castagnei*. Ber. d. Deut. Bot. Gesell., xiii.
23. ——— ('00): Sexual Reproduction in *Pyronema confluens*. Ann. Bot., xiv.
24. ——— ('05): Sexual Reproduction and the Organisation of the Nucleus in certain Mildews. Publ. Carnegie Inst., Washington, No. 37.
25. Kihlmann, O. ('85): Zur Entwickelungsgeschichte der Ascomyceten. Acta Soc. Sc. Fennicae, xiv.
26. Lindau, G. ('88): Ueber die Anlage und Entwickelung einiger Flechtenapothecien. Flora, xlvi.
26*a*. Maire, R. ('03): Recherches cytologiques sur le *Galactinia succosa*. C. R., Paris, 9 Nov.
27. Salmon, E. S. ('07): Cherry Leaf Scorch. Journ. Board of Agriculture, London, xiv.
28. Stahl, E. ('77): Beiträge zur Entwickelungsgeschichte der Flechten. Leipzig.
29. Stoppel, R. ('07): *Eremascus fertilis*. Flora, xcvii.
30. Van Tieghem, Ph. ('84): Traité de Botanique.
31. Vuillemin, P.: Les bases actuelles de la systématique en mycologie. Progressus Rei Botanicae, 1907, p. 46.
32. Welsford, E. J. ('07): Fertilisation in *Ascobolus furfuraceus*. New Phyt., vi.

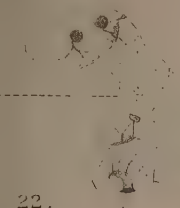
EXPLANATIONS OF PLATES XLVIII AND XLIX.

Illustrating Mr. Brooks's paper on *Gnomonia*.

All the figures have been drawn with the aid of the camera lucida.

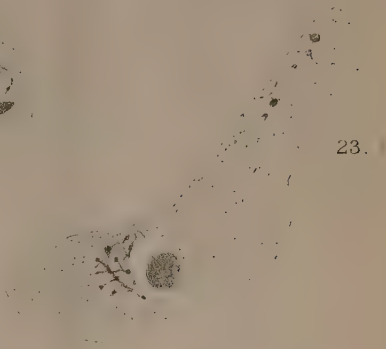
Fig. 1. Mycelium of *Gnomonia erythrostoma*. × 680.
Fig. 2. Single vegetative nucleus. × 2,500.
Fig. 3. General view of spermogonium. × 380.
Fig. 4. Part of spermogonium. × 1,300.
Fig. 5. Fresh spermatia. × 400.
Fig. 6. Spermatium to show structure. × 3,300.
Fig. 7. Tuft of trichogynes. × 680.
Fig. 8. Tuft of trichogynes with 'coil' below. × 680.
Fig. 9. 'Coil' with ascogonium. × 680.
Fig. 10. Central portion of 'coil' showing ascogonium. × 680.

Fig. 11. Central portion of 'coil' showing ascogonium. × 2,500.
Fig. 12. Trichogyne not connected with a 'coil'. × 1,800.
Fig. 13. Proliferation of trichogynes. × 680.
Fig. 14. 'Coil' cut parallel to leaf surface (only a portion drawn; *a* = ascogonial cells, *b* = vegetative cells, cells not drawn are like *b*).
Fig. 15. 'Coil' in resting state. × 680.
Fig. 16. 'Coil' in resting state (central part only drawn). × 1,800.
Fig. 17. Early stage in development of perithecium. × 680.
Fig. 18. Differentiation of ascogenous cell from a vegetative cell. × 2,500.
Fig. 19. Nuclei of young ascogenous cells (other line represents position of perithecial wall). × 2,500.
Fig. 20. Ascogenous cell towards base of perithecium. × 2,500.
Fig. 21. Conjugate division. × 2,500.
Fig. 22. Ascogenous cell and young ascus. × 2,500.
Fig. 23. Ascogenous cell with ascus nucleus. × 2,500.
Figs. 24–26. Stages in formation of asci. × 2,500.
Fig. 27. Nuclear fusion. × 2,500.
Fig. 28. Contraction of net-work in ascus nucleus. × 2,500.
Fig. 29. Ascus nucleus at stage in which net-work stains with difficulty. × 2,500.
Fig. 30. Chromosomes of first division before their arrangement on spindle. × 2,500.
Figs. 31–33. First nuclear division.
Fig. 34. Separate chromosomes of first division. × 2,500.
Fig. 35. Telophase of first division. × 2,500.
Figs. 36, 37. Binucleate stage (only part of ascus drawn). × 2,500.
Figs. 38, 39. Second division, telophase. × 2,500.
Figs. 40, 41. Quadrinucleate stage (only two of the four nuclei fully drawn in Fig. 40). × 2,500.
Fig. 42. Third division, metaphase. × 2,500.
Fig. 43. Third division, anaphase. × 2,500.
Fig. 44. Third division, telophase. × 2,500.
Fig. 45. Division in spore. × 2,500.
Fig. 46. Ascus after formation of spores. × 680.

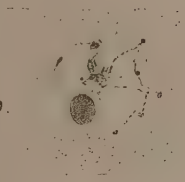


22.

24.

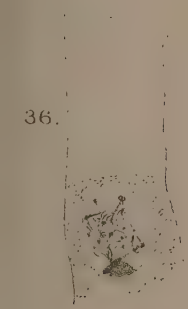


23.

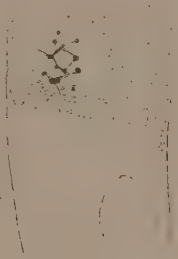


29.

30.



36.

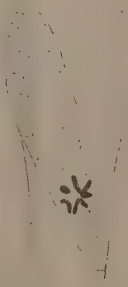


37.

38.

43.

44.



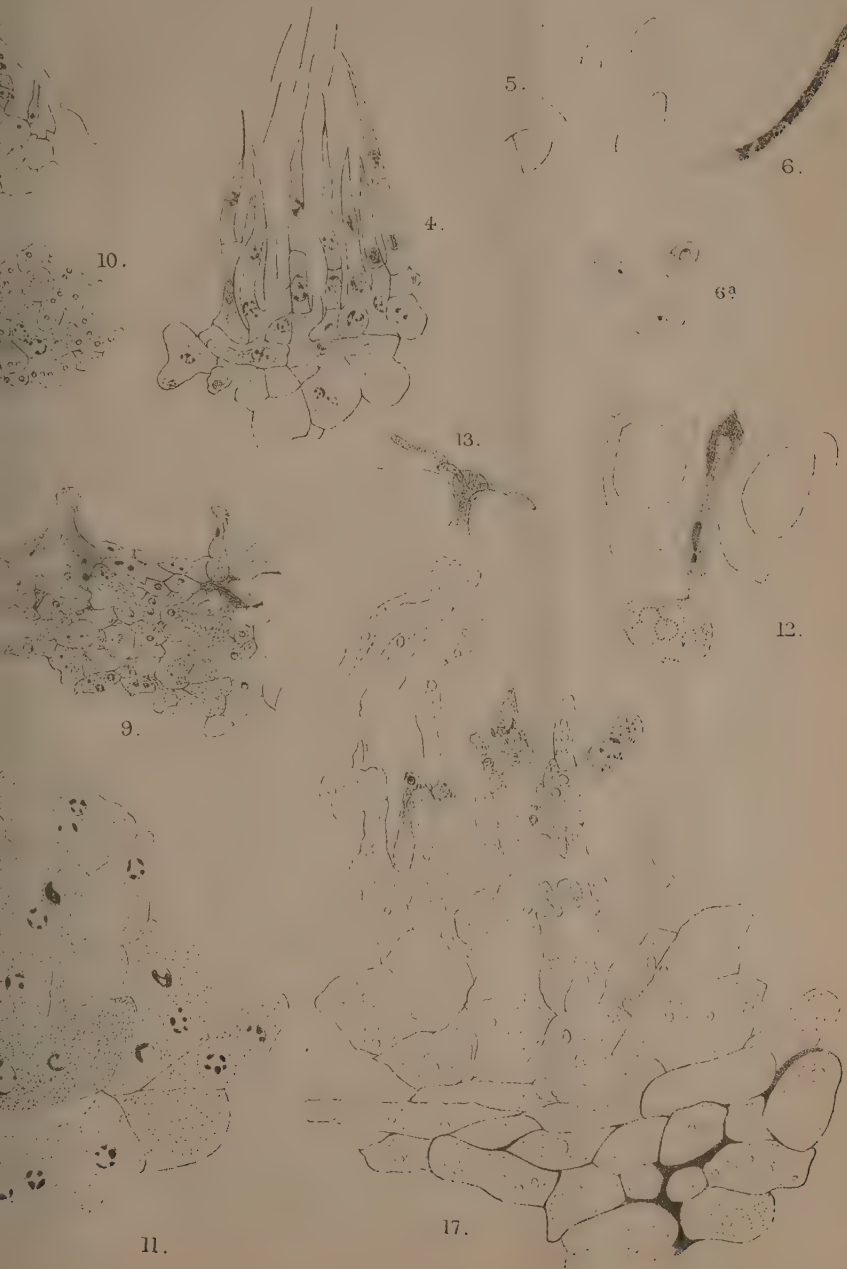
45.

46.

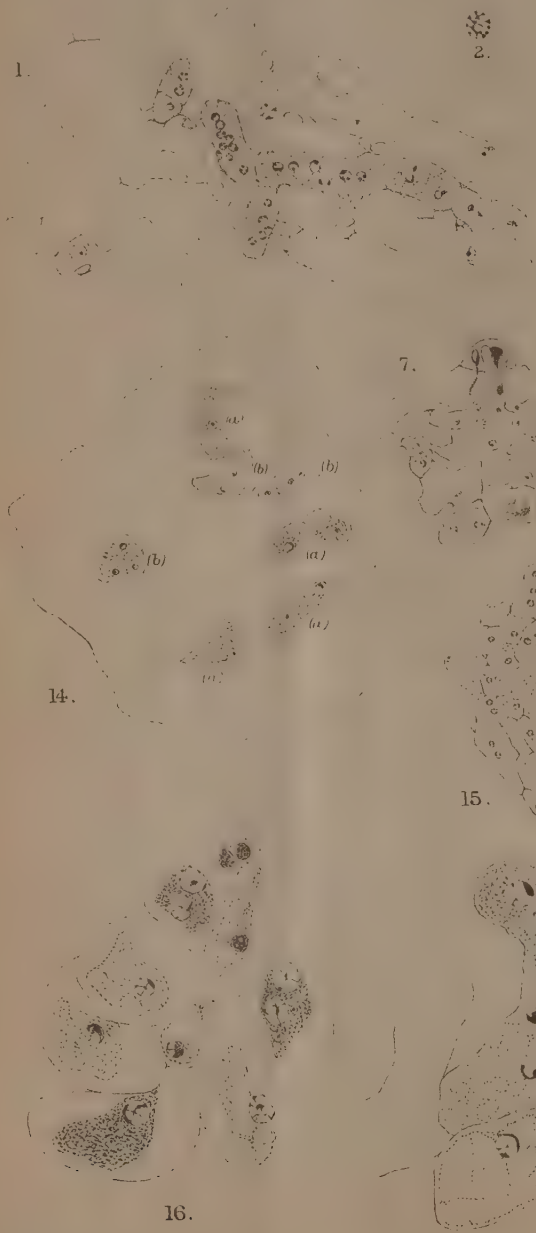
Huth, lith. et imp.

F.T.B. del

BROOKS — GNOMONIA.



Huth, lith et imp.



F.T.B. del.

BROOKS — GNOMONIA.

On the Development of the Fructification of Armillaria mucida, Schrad.

BY

CECIL C. E. FISCHER,

Indian Forest Service.

With Plate XXXV.

ARMILLARIA MUCIDA is a hymenomycetous fungus commonly met with in England wherever the beech grows. Its fruit-bodies appear in autumn, growing in tufts on the diseased portions of beech trees, and are readily identified by the (usually) intense white of the pileus, which, further, is covered with a mucilaginous coating.

The fungus is fairly abundant on the older beech trees in Windsor Park, where it seems to be doing considerable harm.

There appears to be some diversity of opinion as to its true parasitic nature, and partly for this reason I undertook a study of its life-history, the results of which will be embodied in a separate paper. The opportunity for tracing the course of the development of the fructification naturally presented itself, and this forms the subject of the present note.

Comparatively little attention has been given to the development of the fructification in Hymenomycetes. One of the most recent papers on the subject is that of G. F. Atkinson on *Agaricus campestris* (1), in 1906. Prior to this paper no detailed study of the development appears to have been made since Fayod's work (3) in 1889.

Atkinson gives an historical sketch of previous work in this direction in the paper quoted above; consequently no lengthy *résumé* need be given here.

Atkinson suggests, apparently with justification, that the earlier investigators did not examine sufficiently young specimens, and they seem to have been led to general conclusions which do not hold good at any rate in all cases.

De Bary in the case of *Agaricus campestris* (2) and R. Hartig in that of *Armillaria* (*Agaricus*) *mellea* (5) describe the veil (*velum partiale* of Fries) as developing by new growth. They find that at an early stage a circular

[Annals of Botany, Vol. XXIII. No. XCI. July, 1909.]

The pileus assumes a globular shape by continued growth, still further separating the hymenium from the 'neutral tissue', which increases the depth of the gill cavity (Fig. 7 B).

The size of the sporophores does not necessarily correspond with the degree of development, so that it is not possible to indicate the stages of growth by external description. ~~This will be seen by comparing Figs. 5 and 6, both drawn to the same scale, 5 being the younger stage.~~

Soon after the last described stage the lower portion of the pileus begins to grow out and upwards, stretching the neutral tissue to which it is still attached by its margin (Fig. 8 B).

By this time the universal veil has entirely disappeared, as also the loose lacunar tissue which surrounded the stipe and was previously covered by the veil. It is at this stage that the mucilaginous coating begins to appear on the surface of the pileus.

The neutral tissue is much drawn out by the outward growth of the pileus, and becomes very loose and almost diaphanous by the separation of its elements. This is the *velum partiale*. Sooner or later it is ruptured at the edge of the pileus, sometimes not till the latter is nearly horizontal, remaining attached to the stipe as the *annulus superus*.

During this last period of development the hymenial layer differentiates its elements of basidia, paraphyses, and cystidia. The spores are formed before the rupture of the veil, and I found them capable of germination even when the veil had to be pierced to obtain them.

The mucilage of the pileus is derived from the disintegration of the extremity of the palisade layer laid bare by the disappearance of the universal veil, the remainder of the palisade layer persisting. That the mucilage is due to decomposition and is not merely a secretion is evidenced by the particles and rounded cells found embedded in it (Fig. 8 A). The mucilage gave an acid reaction with litmus paper.

Summarized, the results are as follows:—

I. A universal veil exists which disintegrates after the differentiation into primordial stipe, pileus, and hymenium.

II. The origin of the hymenium is *endogenous*.

III. There is no separation of pileus and stipe by the formation of an annular air-space.

IV. The marginal veil (*velum partiale*) *is not an aftergrowth*, but is formed by the neutral tissue, which is present from the beginning.

V. The mucilaginous coating of the pileus is derived from the degeneration of the apical portion of the palisade tissue.

An early examination of the very young stages of the sporophores of *Armillaria mellea* seems called for. This species is readily cultivated in the laboratory (see Brefeld's 'Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet

der Mykologie'), so that a sufficient supply of carpophores in all stages of development could be secured without difficulty.

I embrace this opportunity to express my best thanks to Professor J. B. Farmer, F.R.S., at whose suggestion this study was undertaken, for his kind encouragement, and to acknowledge my indebtedness to his valuable advice.

Literature quoted.

1. Atkinson, G. F.: Development of *Agaricus campestris*. Botanical Gazette, vol. xlii, 1906.
2. De Bary: Morphologie und Physiologie der Pilze. 1886.
3. Fayod: Prodrome d'une histoire naturelle des Agaricinées. Ann. Sci. Nat., Bot., vii, 9, 188[illegible].
4. Goebel: Outlines of Classification and Special Morphology of Plants. English edition. 1887.
5. Hartig, R.: Wichtige Krankheiten der Waldbäume, &c. 1874.

EXPLANATION OF FIGURES IN PLATE XXXV.

Illustrating Mr. Fischer's paper on the Development of the Fructification of *Armillaria mucida*, Schrad.

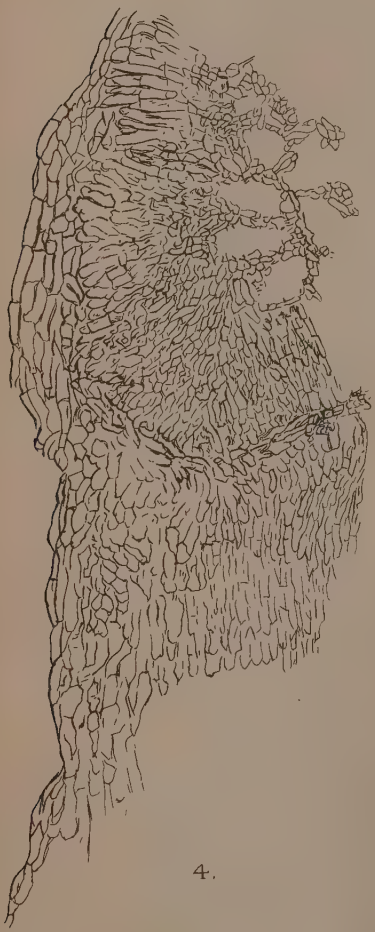
Fig. 1. Young stage showing loose texture in centre of the undifferentiated sporophore. × about 35.
Fig. 2. Subcuticular palisade layer forming the primordium of the pileus. × about 35.
Fig. 3. The same enlarged to show details of structure and the *velum universale*. × about 470.
Fig. 4. Somewhat further accentuated palisade tissue. × about 470.
Fig. 5. Sporophore showing primordium of the hymenium, the gill cavity and the lacunar texture of the subcortical tissue covering the stipe. × about 35.
Fig. 6. Further stage—the universal veil beginning to disintegrate. × about ~~35~~ 470.
~~Fig. 7. The same enlarged to show details. × about 470.~~
Fig. 7. The universal veil and loose tissue around the stipe have entirely disappeared. The neutral tissue is still attached to the margin of the pileus. × about 25.
Fig. 8. Section through pileus of ripe carpophore to show decomposition of the outer part of the palisade tissue to form mucilage. × about 315.

Royal College of Science, South Kensington.
May, 1909.

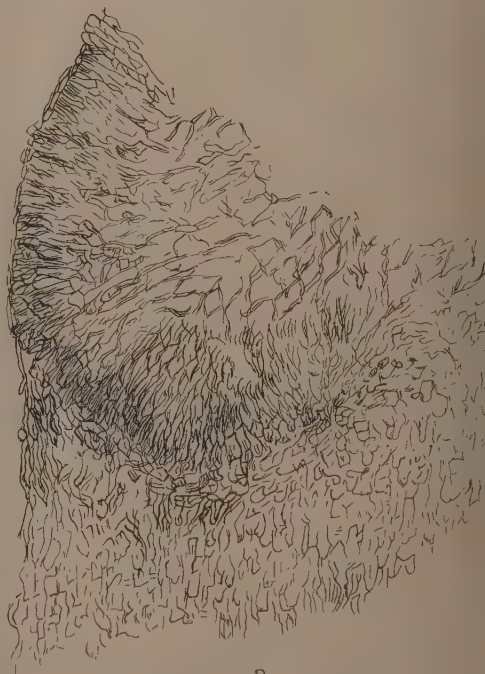
1.

2.

5.

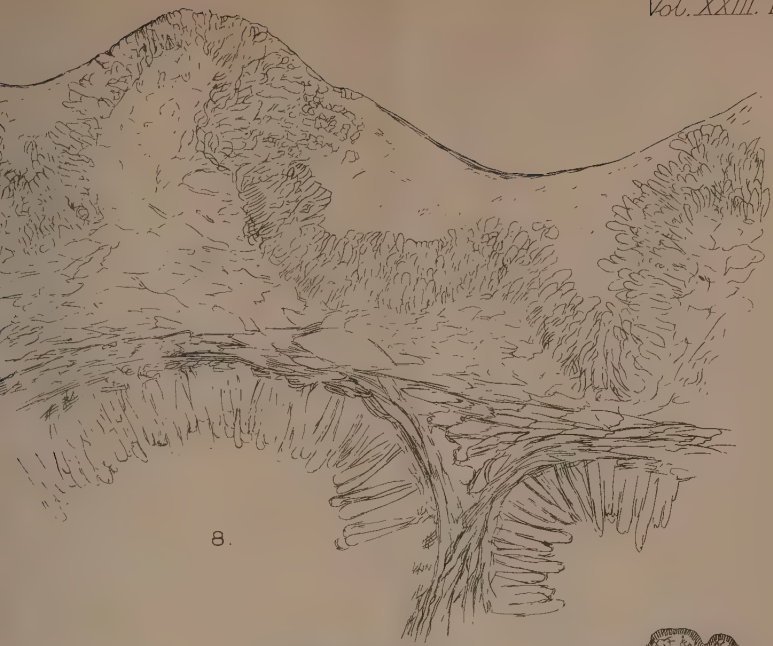


4.

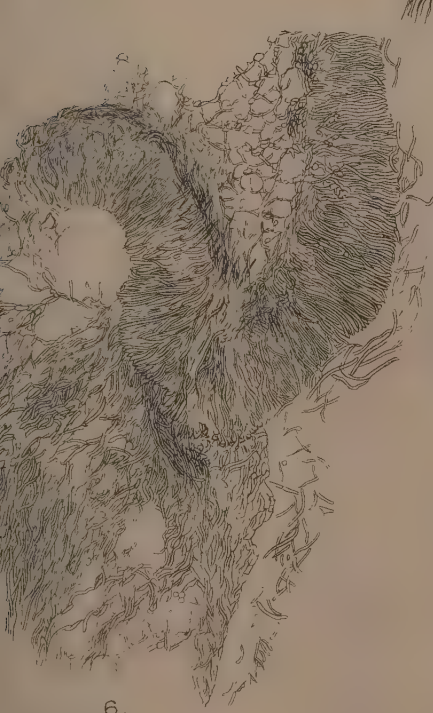


3.

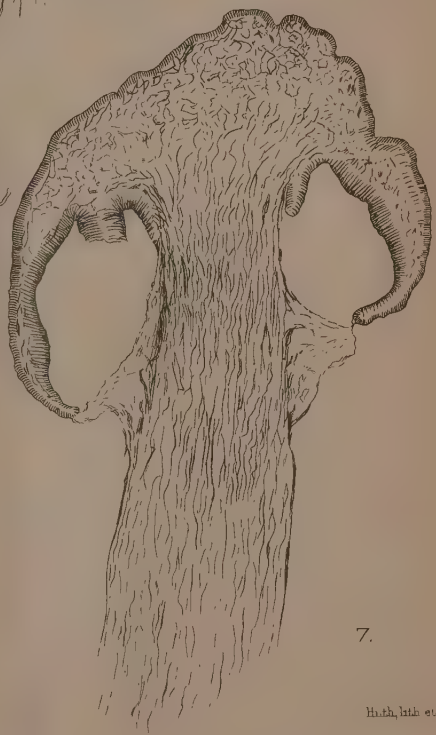
FISCHER — ARMILLARIA MUCIDA.



8.



6.



7.

Huth, lith et imp

NOTE ON THE BIOLOGY OF *PESTALOZZIA HARTIGII*, TUBEUF.

By

CECIL E. C. FISCHER,

Indian Forest Service.

With Plate VII.

History and Present Knowledge.

Pestalozzia hartigii is a fungus falling in the *Phragmosporae* section of the *Melanconieae*, a group of the Fungi Imperfecti, or Higher fungi, of which the conidial form alone is known.

It is recognised as the active agent of a seedling disease (*Einschnürungskrankheit*) of several timber trees in Europe. The evidence of its connection with the disease, however, is based entirely on the observation that it is always present when the constriction characteristic of the malady appears.

Before the relation between the parasite and the disease was established by von Tubeuf in 1888 (2), the cause of the latter was variously ascribed to frost, drought and similar agencies. Hartig, for instance, believed it to be due to compression by the mechanical action of freezing soil (1).

Both natural and nursery seedlings, one to five years old, of beech, ash, maple (3), spruce and silver fir (2), have been reported to be subject to attack.

The constriction invariably appears on the stem just above the level of the soil, and is due to the death of the cambium all round, whereas the tissues immediately above, and to a certain extent below as well, continue to grow till the death of the whole plant.

No connection between any species of *Pestalozzia* and any of the definite groups of the Higher fungi has yet been demonstrated, so that the genus still awaits final classification.

Life-History.

Methods.—The original cultures were started with conidia from spruce seedlings that had died of the disease, and which had been sent to Professor C. von Tubeuf from one of the Bavarian Forest Divisions.

[Journ. Econ. Biol., September, 1909, vol. iv, No. 3]

The cultures were first started on a jelly of meat and malt extract in Petri-dishes, and were subsequently inoculated on bread moistened with sterilised water.

The work was begun at Professor von Tubeuf's laboratory at Munich and continued at the Royal College of Science, South Kensington. Two cultures, one on bread and one on beech twigs, were brought over from Germany in Erlenmeyer flasks.

For observation of germination in hanging drops, water, prune juice and jellies of beer-wort and of meat and malt extract were employed.

In Petri-dishes a jelly of meat and malt extract formed the nutritive substance, and the more permanent cultures in flasks were on bread and on beech twigs.

Growth of Mycelium and Fructification.

In nature, on living plants, as a rule, no external mycelium is to be seen; the signs of its presence are confined to small black pustules, full of spores, on the surface of the bark at the stricture.

These spores, or rather conidia, are four-celled, with the cells in one row. The two central cells are dark brown and opaque, the end ones hyaline. The apex is provided with two to five long hyaline cilia (Pl. vii, figs. 1, 6, 8). There is a hyaline stalk of variable length. The hyaline parts collapse readily and the cilia are easily broken off, so that when mature the conidia often appear two-celled only, both cells being dark and opaque, with a small hyaline papilla at each extremity. In this condition the conidium is barrel-shaped, and was so described in the earlier text books.

In any of the nutritive media detailed above, the conidia germinated abundantly in less than eighteen hours. Normally, only one of the dark cells puts out a germ tube, but occasionally both germinate (Pl. vii, fig. 7). The germinating cell swells out to assume a spherical shape, and puts out a small process (Pl. vii, figs. 1, 7), which rapidly grows out as a colourless germ tube full of oil drops (Pl. vii, figs. 2, 3, 4, 6).

The germ tube soon forks and branches (figs. 5, 7, 10) to form an elaborate system of hyphae. On bread the mycelium extends over the surface as a white felting and penetrates throughout the substratum. On twigs the mycelium not only covered the surface, but spread out between the twigs in a sheet, binding them together and to the sides of the containing flask.

In all the cultures conidia identical with those already described were formed sooner or later. The earliest reproduction of conidia

occurred in fourteen days, but in some cases fructification was delayed up to forty days.

The conidia arise in pseudo-pycnidia, which are recognisable as small black dots scattered irregularly over the surface of the culture. From these exude large drops of an apparently black liquid, which, under the microscope, can be seen to contain dense masses of the conidia. These conidia were found to germinate as readily as those which yielded the parent cultures.

In some cases a very short germ tube was produced and a new conidium appeared very close to the original one (Pl. vii, fig. 8), but, generally, it was only after a considerable development of the hyphae that fructification set in.

In hanging drops the conidia sometimes grew out singly and remained solitary, but more often they were formed on a side branch, and a number of others would eventually appear on the same or adjacent hyphae to form clusters (Pl. vii, figs. 9, 10, 11, 12). In the hanging drops no approach to a pycnidium was constructed, but, no doubt, in the large cultures the clusters are sunk in the mycelium giving the semblance of pycnidia.

In one hanging drop culture a peculiar growth presented itself. The hyphae were more abundantly septate than usual, and apparently successive conidia were put forth. (Pl. vii, fig. 13).

At first the young conidia are undivided, eciliate and colourless, and later begin to darken and become opaque (Pl. vii, fig. 10). Presently a single median septum is formed, and at that stage the conidium is two-celled and brown. It is only after a further stage of development that the hyaline end cells and the cilia are produced. (Pl. vii, fig. 9).

No other reproductive organs of any kind were observed in any of the cultures.

Inoculation Experiments.

In order to ascertain the manner in which plants are infected in nature the following experiments were carried out:—

Seedlings, one to five years old, of the species detailed below, were planted in pots: Beech, hornbeam, ash, maple, oak, silver fir, spruce, Scotch pine, Weymouth pine, and larch.

Inoculations were made in the following ways:—

Conidia from the pure culture to be employed were first tested and found to germinate freely. They were then extracted in quantities from the culture, and immersed in a spraying-flask in sterilised water. After thorough mixing, a drop of the fluid was

placed under a 1-6in. objective, with a No. 2 eye-piece, and an average of twenty conidia were counted in the field of view.

1. An incision was made with a sterilised blade on the stem of the plants to be inoculated just above the soil, and two drops of the liquid were allowed to fall on the wound, which was then occluded with grafting wax.

2. A similar treatment was carried out on roots below the soil level. The wound was occluded and the soil replaced.

3. The whole of the plant above ground was sprayed with the water containing conidia in suspension, no intentional wound to the plant being inflicted.

4. A small wound was made on the roots, and the soil was watered with the conidia carrying water.

5. The soil was similarly watered, but without damaging the roots.

6. A cut was made on the stem close to the soil level, and conidia were conveyed to the wound direct from a pure culture. The wound was bound up with strips of bast sterilised in alcohol, the spirit being allowed to evaporate off first.

7. A twig was broken off and the exposed surface was smeared with conidia taken direct from a pure culture. The area so treated was bound up with sterilised bast.

8. Finally, sections from a beech twig in the pure culture already referred to were grafted on stems and twigs.

In all cases control plants were set aside for comparison.

Altogether fifty-six plants were inoculated on four occasions: On the 18th December, 1908; 8th January, 5th February, and 8th May, 1909.

In no case did infection result from the inoculation.

Discussion of Results.

It seems that conditions of the nature of which we have at present no knowledge must co-exist in order that infection may take place.

The first two experiments, those of the 18th December and 6th January, were effected on plants that had just been procured and potted, so that they were, in all probability, in a condition of lowered vitality and, therefore, should have been specially susceptible.

It is possible that the co-operation of other organisms is necessary to enable *P. hartigii* to actively attack its host plants. On examining the diseased spruce plants sent into the laboratory at

Munich, I found that several other fungi, including a Penicillium and a yeast, and Bacteria were also present.

It is possible, also, that the first three experiments were made at an unfavourable time of year, and it is desirable that further attempts be made during the summer months. Unfortunately, I am not in a position to continue the research.

The disease is of considerable importance, as serious losses are occasioned in nurseries. The death of up to 30 per cent. of the seedlings has been reported from some Forest Divisions in Germany through the agency of this pest. In the present state of our knowledge, however, no protective steps can be suggested beyond the maintenance of the best cultural conditions in the nursery, so as to ensure strong healthy plants.

The only remedy that can be recommended in the absence of fuller information is the prompt removal and burning of all infected plants.

Summary.

I. The conidia of *Pestalozzia hartigii* germinate readily in water, prune juice, and a jelly of meat and malt extract, within eighteen hours.

II. The fungus can be grown on bread and on sterilised beech twigs.

III. Conidia were reproduced in these cultures in from fourteen to forty days.

IV. No other form of reproductive organs were obtained during eight months culture.

V. All attempts at artificial infection of living plants failed.

My best thanks are due to Professor C. von. Tubeuf for suggesting the investigation, and to Dr. E. Münch for valuable advice during the initial stages of the research.

LITERATURE.

1. **R. Hartig.**—"Allgem. Forst-und Jagd-Zeitung," 1883.

2. **C. von. Tubeuf.**—"Beitraege zur Kenntniss der Baumkrankheiten," 1888, p. 40.

3. **C. von. Tubeuf.**—"Pflanzenkrankheiten," 1895, p. 510.

Also an article by the last named author in the "Forstl. Naturwissenschaftliche Zeitschrift," November, 1892, p. 436.

EXPLANATION OF THE PLATE VII.

Illustrating Mr. Cecil E. C. Fischer's paper "On the Biology of *Pestalozzia hartigii*, Tubeuf.

All the figures were drawn with the help of the camera lucida.

Fig. 1.—Germinating conidium. × about 475.

Fig. 2.—Conidium with germ tube. × about 475.

Figs. 3, 4, 5, 6, 7.—Conidia with germ tubes. × about 250.

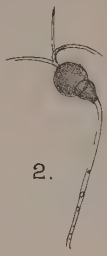
Fig. 8.—Short germ tube with new conidium formed near its parent conidium. × about 250.

Figs. 9, 10, 11, 12.—Progressive growth of conidia in clusters. × about 250.

Fig. 13.—Multi-septate hyphae producing successive conidia. × about 325.

Imperial College of Science,
South Kensington.
June, 1909.

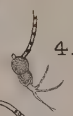
1.



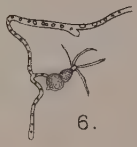
2.

3.

7.



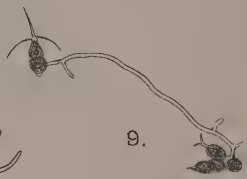
4.



6.

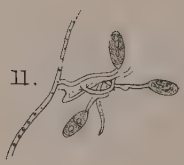
5.

8.



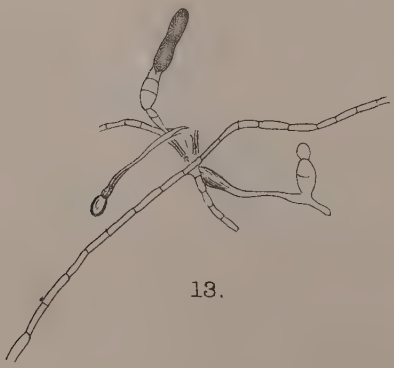
9.

10.



11.

12.



13.

el.

Huth, Sc. et imp

PESTALOZZIA HARTIGII, Tubeuf.

The Biology of Armillaria mucida, Schrader.

BY

C. E. C. FISCHER,

Indian Forest Service.

With Plates XXXVII and XXXVIII.

ARMILLARIA MUCIDA is a widely distributed gill-fungus wherever the beech occurs. Saccardo (23) gives its habitat as '. . . totius Europae et Americanae federatae, frequens,' and according to McIlvaine (16) its distribution in America extends to the States of North Carolina, Pennsylvania, and West Virginia.

There appears to be no special literature on the subject of this plant, and a perusal of the references to it in textbooks and floras leaves some doubt in the mind as to whether it should be described as a parasite of the beech or as a saprophyte on dead beech wood. Generally speaking, we may take it that the older works treat it as a saprophyte and more recent ones as a parasite, as will be seen from a perusal of the following extracts.

Schrader, 1794 (24), says: 'Hab. ad Fagos emortuas'; Fries, 1821 (10): 'In truncis vetustis, apprime Fagi'; Patouillard in 1886 (19) gave: '. . . sur les troncs pourris'; Lambotte (13) has: '. . . parmi le gazon, sur les racines ou sur les troncs coupés du hêtre.'

On the other hand, we have Massee's account (15) of a successful infection: 'At High Beech, Epping Forest, . . . a healthy branch of a beech having been broken off, the wound was inoculated with the spores of *A. mucida*. At the end of the second season after the inoculation the branch was killed for a considerable distance, and the sporophores of the fungus appeared in abundance. The spores also germinate readily on very small wounds made in the bark.'

It is obvious that sufficient information has not been given, and in the absence of statement to the contrary we are justified in believing that no precautions were taken to exclude infection by other fungi. Some parasitic fungus, e.g. *Polyporus fomentarius*, may have gained entry and prepared the way for *A. mucida* by killing the tissues.

Cooke (6), in 1906, wrote of this same fungus: '. . . so commonly seen on beech trees . . . has been charged with being a wound parasite, capable

[Annals of Botany, Vol. XXIII. No. XCII. October, 1909.]

of attacking a healthy branch when broken or wounded and causing death and decay.' This statement is probably inspired by Massee's report quoted above. Sorauer, in 1906 (25), also evidently accorded it parasitic rank, since he refers to it in his work: 'Von der Gattung *Armillaria* wäre in erster Linie *A. mucida* zu erwähnen,' but he adds: '. . . über die Art des Parasitismus wissen wir nichts.' Finally, we have the following authors who make no reference to it as a parasite: Tubeuf (26), Prillieux (21), and Frank (9) omit all mention of it; Saccardo (23) states: 'Hab. ad truncos Fagi'; Gillot and Lucaud, 1891 (12): '. . . exclusivement sur les vieux troncs de hêtres'; Gautier (11), in 1884: '. . . sur les troncs de hêtres languissants ou coupés depuis peu'; McIlvaine (16): '. . . on beech trees and roots . . . pushing up through the soil'; Rabenhorst (22): 'An Buchenstangen.'

It seems, therefore, highly desirable that further tests be applied to determine whether the fungus is a parasite or a saprophyte. The experiments described later clearly demonstrate that it can attack dead beech wood, but so far give no evidence of a true parasitic nature. However, let me at once admit that my experiments were neither sufficiently numerous nor extended over a sufficient space of time to traverse the theory of parasitism. Indeed, I am far from claiming to have proved that *Armillaria mucida* is *not* a parasite, but I am of opinion that more evidence, and of a positive character, is required before we accept that view. It is true that perfectly healthy trees in full vigour bear branches from which the fructifications of this fungus extrude, but in all cases the tissues in the neighbourhood of the tufts of carpophores are dead, and this is also the case when the tufts are seated on diseased parts of the main trunk itself. It should not be forgotten, moreover, that our knowledge of the causes predisposing to disease is almost negligible. Buller (4) failed to infect living maple and horse-chestnut trees with the spores of *Polyporus squamosus,* and in his paper remarks: 'Possibly in nature other organisms serve to prepare the wounds for infection by the fungus.' This 'preparation' might be the killing of the tissues in advance of the fungus under consideration, which then would be an *obligate saprophyte* and no longer even a *facultative parasite.* This should be borne in mind in connexion with Massee's account of his experiment commented on earlier. This point will be dealt with further when we come to discuss the results of the inoculation experiments.

Description of the Fungus.

A description of the fruit body of *A. mucida* will not be out of place, and the following is compiled from those of Cooke (5) and Massee (14):—

Pileus 1 to 4 inches across, flesh thin and almost diaphanous, hemispherical, then expanded, obtuse, often rugulose; glutinous, whitish or tinged with grey (by some authors described as often much darker); often

growing in clusters (Pl. XXXVII, Figs. 1 and 2); gills white, rounded behind, and broadly adnexed with a line-like decurrent tooth; *stipe* 2 to 5 inches long, rather slender, but thickened at the base; white, but base often with sooty squamules, rigid, stuffed; ring near apex of stipe, white tumid; *spores* elliptical, very shiny, 14 to 16 by 8 to 9 μ.

Massee adds: 'Very variable in size. Readily known by the very shiny pileus, which is usually whitish, but sometimes sooty or olive brown. Solitary or caespitose.'

It may be added that there are three vulgar names for this fungus in England: 'Beech Tuft,' 'Beech Agaric,' and 'Clammy Armillaria.'

The descriptions by all other authors that I have consulted agree with that given above, with the exception of the statement as to the shape of the spores. Brefeld (2) refers to them as '. . . fast runden Sporen,' and Patouillard (19) figures them spherical or nearly so. This discrepancy is to be explained in the same way as Münch settled the controversy between Möller and Malenconvié as to the shape of the spores of *Merulius lachrymans* (17). Münch showed that those spores when quite dry are collapsed and boat-shaped, but swell out when moistened, though only by the breath, to an oval outline. I find the same phenomenon in the case of *A. mucida*, and that when moist the spores are almost perfectly spherical with a small insertion papilla and granular contents (Figs. 3 and 4), with an average diameter of 14 μ. The utility of this adaptation for dispersal is obvious, for the convexity when dry, coupled with the lightness due to absence of water, gives a better prospect of transport by wind. Dr. Münch himself showed me a similar process with the spores of other fungi, among them one or two Ascomycetes. It seems probable that it occurs in most, if not all, fungi with smooth-walled spores that depend on wind for dispersal.

Subject of the Investigation.

The object of this inquiry was threefold:—

1. To trace out the life-history of the fungus, at the same time determining its true nature—parasitic or saprophytic.

2. To investigate its action on the wood.

3. To suggest appropriate preventive and remedial measures.

Each of these three will be dealt with separately and in the above order.

I. Life-History.

Methods.—The fruit bodies from which all the cultures were started were obtained from beech trees in Windsor Park on November 18 and 27, 1908. On the second occasion I took a sterilized Petri-dish with me, and one sporophore was placed directly in it. The spores shed on the

bottom of the dish were used for starting cultures, as also were spores obtained in a similar way in the laboratory from the carpophores brought in on the first occasion. These spores were taken off with a sterilized needle and inoculated into nutritive media.

Some of the cultures were started by means of a neat contrivance invented by Dr. Münch and described by him in his inaugural dissertation (18). A piece of cloth (velvet is very suitable) with a circular hole cut out of its centre, of a smaller diameter than the mouth of the vessel that is to contain the culture, is sewn on to a piece of wire mesh. It is best to cut the cloth so as to allow a sufficient overlap to fold back and cover any object that is placed on the wire.

The stipe is cut off a carpophore and after testing it to make sure that it is actively shedding its spores, the cap is deposited on the wire net in such a position that a portion shedding spores comes directly over the hole in the cloth. The whole is thoroughly wetted, and the superfluous moisture is vigorously shaken out in order to avoid any flow of water. With one hand the vessel containing the culture solution is opened, and the wire net with the cap is slipped on with the other with the least possible interval, and is so fitted that the hole in the cloth coincides with the mouth of the vessel. After the lapse of a few minutes, long enough to allow of the deposition of a sufficient number of spores, but not for the drying up of the cloth, the apparatus is removed and the stopper slipped back with the same caution as before. As long as the apparatus is thoroughly damp it is only the spores that are thrown off by the fungus and which pass through the meshes without touching the wire that can fall on the nutritive solution. All spores that touch the damp wire, including foreign ones that may have been previously adhering to any part of it or to the cap, will stick to it and will not fall through. It will be seen that in this way one can secure, practically with certainty, and without previous tedious separate *eliminating cultures*, a quite pure culture. Dr. Münch has employed this method with practically unfailing success in the course of many hundreds of pure cultures, and I have also obtained good results with it on a smaller scale. Dr. Münch, however, will be the first to agree that its results must not be accepted uncorroborated by other cultures started in other ways. Of course, this appliance can only be used with fungi which throw off their spores more or less violently.

The culture solutions employed were the following :—

For observation of the germination of the spores: hanging drops in moist chambers of prune juice, beer-wort jelly, sterilized water, and meat and malt extract jelly.

For observation of the development of the mycelium and as a source from which to obtain other cultures by inoculation: Petri-dishes containing beer-wort jelly and meat and malt extract jelly.

Finally, for the permanent cultures in which the life-history was to be traced, the substratum used was chiefly bread moistened with water only, or with a decoction of horse-dung. Beech twigs and small cubes of beech wood were also made use of.

The permanent cultures were in bulb or Erlenmeyer flasks.

All glass receptacles were sterilized in the dry oven up to a temperature of 165° C. Bread and beech twigs or cubes were similarly heated in the dry oven, the bread until it was toasted a rich brown, and subsequently moistened.

Liquids were placed in the steam sterilizer for at least one hour after strong steaming had begun on not less than three consecutive days. In addition, in order to exclude bacteria, a little acid was added to the liquids.

The manual methods employed do not essentially differ from those advocated by Brefeld (3), so they need not be described in detail. It will be sufficient to add that I took every care to avoid intrusion by foreign bodies and to keep the cultures absolutely pure. Cultures in which impurities—Bacteria, *Penicillium*, *Mucor*—appeared were promptly destroyed. The flasks were stoppered with cotton-wool, which was invariably burnt in a Bunsen flame before removing from or replacing in the mouth of a flask. The interior of the neck of the flask was similarly subjected to the Bunsen flame.

Altogether the following cultures were instituted: 8 hanging drops in moist chambers; 25 Petri-dish cultures in jelly; 12 on jelly or liquids in flasks; 6 on twigs or wood cubes; 2 on bread in large crystallizing dishes under bell-jars; 23 in flasks on bread; and 4 in liquids in test-tubes.

The meat and malt extract jelly was made up as recommended by Professor von Tubeuf as follows:—

Liebig's meat extract	10 gr.
Malt extract	20 gr.
Gelatine	100 gr.
Citric acid	4 to 5 gr.
Water	1 litre.

In some cases a decoction of horse-dung was added to the above, both with and without the gelatine.

Two other solutions were made up as follows:—

I.	Peptone	·25 gr.
	Dextrose	1·25 gr.
	Potassium phosphate	·075 gr.
	Magnesium sulphate	·005 gr.
	Citric acid	1 gr.
	Water	250 cc.

II.	Ammonium nitrate	2·5 gr.
	Potassium phosphate	1·25 gr.
	Magnesium sulphate	·25 gr.
	Citric acid	·5 gr.
	Water	250 cc.

These were used either as jelly, when 25 gr. of gelatine were added, or in the liquid form.

The permanent cultures were started either by sowing the spores directly on the substratum or by inoculation from other obviously pure cultures.

Germination and Subsequent Growth.

In hanging drops of pure water, prune extract, or beer-wort jelly, as well as in Petri-dishes in beer-wort jelly, the spores germinated abundantly and at once, i. e. in less than twenty-four hours. Placed in the solution one morning they were found with germ-tubes on the following morning, twenty-one hours later. No germ-pore was to be distinguished in the spore-wall, and the germ-tube did not emerge at any fixed point, but in varying positions on the several spores. Prior to germination the spores became vacuolated. On germination the vacuoles enlarge, and the protoplasmic contents of the spore pass into the germ-tube (Fig. 6). The protoplasm advances with the end of the hypha, which becomes septate and empty behind. The hyphae produced in pure water, however, formed few septa.

In addition to spores small pieces from the interior of the stipe and the cap of a sporophore were placed on jelly in a Petri-dish. New growth of hyphae appeared from both in two days (Fig. 7).

A small section of the gill of a fruit body was suspended in a hanging drop ; a few spores were scattered among the basidia. These spores germinated and put out normal hyphae, and the basidia and paraphyses also grew out into curiously branching and distorted and multi-septate hyphae (Figs. 8 and 9).

For the first day or two after germination the hyphae remain unbranched, but then fork and ramify rapidly. The hyphae often fuse at the points of contact. There is a marked contrast in the habit of growth when there is sufficiency or deficiency of moisture. In the first case the hyphae are thick, long, and but little branched ; when too dry they remain fine, shorter, and much branched (Figs. 10 and 11). The hyphae often assume somewhat fantastic shapes: abruptly and angularly branched (Fig. 12), or, on the contrary, gracefully curled (Fig. 13).

In the Petri-dishes the mycelium soon showed above the surface of the jelly as a perfectly white felt, which spread rapidly till it covered the whole surface. In course of time, about twenty-five days, the mycelium

assumed an orange hue underneath. Here, as well as in the cultures on jelly in flasks, the jelly was soon liquefied, showing that the fungus exudes some enzyme capable of liquefying gelatine. No crystals were formed as occurs with *Cordyceps* in jelly.

In most of the cultures clamp-connexions appeared on the hyphae (Figs. 14 and 15), in some cases in abundance. They were also seen in the stipe of a carpophore grown in pure culture, and in one case on a hypha in a wood vessel. This traverses Brefeld's assertion: '. . . ohne Schnallen . . .' (2).

No further changes were observable in any of the jelly cultures, whether in dishes or in flasks, or in hanging drops, or in any of the fluids experimented with. No fruit bodies or reproductive organs of any kind presented themselves. It would seem, therefore, that *A. mucida* is devoid of all form of conidia, a conclusion not altogether unexpected. In one rather doubtful case, in a hanging drop of water, something recalling *oidia* formation took place. The chamber had been allowed to dry and was nearly devoid of moisture, and the hyphae broke up into short lengths. This, however, was in one corner only, and I was unable to separate the short rods and test them for germinative power. Though I attach no importance to the occurrence, the fact is here stated for what it is worth. The rods are delineated in Fig. 16.

Attempts were made to stimulate the mycelium to produce conidia by altering the nutriment, but in vain. The amount of moisture, too, was varied; in one case the mycelium being allowed eventually to dry up altogether. The kind and quantity of acid was changed, lactic, gallic, and even oxalic acid being tried. With 0·4 per cent. of the last named the fungus grew just as well as in any of the other solutions.

Spores were also sown in the liquid solutions detailed previously. Though they gravitated to the bottom of the test-tubes, they nevertheless germinated, and the mycelium eventually made its way to the surface of the liquid, where it formed a dense felting.

An attempt was made to grow the fungus from spores, and also the mycelium from another culture, on sterilized elm twigs. No infection took place in spite of repetition, which apparently indicates considerable specialization in favour of beech.

As already stated no difficulty was met with in the germination of the spores when fresh. Some observations were made with regard to the endurance of germinative power. A cap obtained from a beech tree in Windsor Park was placed in a sterilized Petri-dish on November 20, and spores were shed on it, after which the cap itself was removed. The spores in the dish were kept quite dry, and were tested from time to time. By December 29 they had suffered already, for they no longer germinated at once, but took ten days to produce germ-tubes. Spores sown in fluid on

January 5 germinated in a similar period, but in this case it was obviously difficult to make certain of germination at once on occurrence. Sown on the same solution with gelatine added on January 6 they failed altogether to germinate. But on the next day spores were sown on a jelly of meat and malt extract mixed with a decoction of horse-dung and acidulated with oxalic acid, and these germinated in ten days. Attempts made with spores from the same source at later dates were entirely unsuccessful.

This indicates no great endurance of germinative power, and as the fruit bodies ripen from August to December, infection must take place in autumn and the first half of winter; in other words, at a time when there is least sap in the host tree.

The spores formed on the carpophores grown in pure culture (as described later on) were slightly smaller than those found in nature, having an average diameter of 12 to 13 μ as against 14 μ (Fig. 5). They germinated readily in water and in meat and malt jelly within twenty-four hours when fresh. These spores kept in a dry Petri-dish failed to germinate when four months old.

From the jelly cultures single germinated spores and pieces of mycelium were taken to start the permanent cultures on bread.

On the surface of the dense felted mycelium, both on bread and on jelly, beads of a clear brown fluid appeared.

On bread and on wood the fungus first showed itself in the shape of erect white flocculent hyphae about $\frac{1}{4}$ inch long. These soon became denser and formed a thick layer of perfectly white felted mycelium.

Pieces of mycelium grown on bread were found to be capable of further development on a jelly made with 12 per cent. gelatine and pure water, the jelly being liquefied in a few days. Also, in a solution of 20 per cent. glucose, both fluid and in a jelly with 12 per cent. gelatine, similarly inoculated mycelium grew on actively, liquefying the jelly as before.

Sporophores.

We will now follow the development of the fruit bodies in the cultures.

On November 28 a culture was started in an Erlenmeyer flask on beer-wort jelly by Münch's method of direct sowing described above. By the 30th of the same month it was evident to the naked eye that germination had taken place, and by December 24 the whole surface of the jelly was covered with a film of white mycelium. On that date a very small piece of mycelium was extracted and placed in another flask on bread moistened with a decoction of horse-dung acidulated with gallic acid. In two days it became obvious that the inoculation had been successful, and in a few days the white mycelium completely concealed the bread. On January 27 the first signs of fructification appeared, and eight days later the first sporophore attained maturity. Thus from germination of the

spore to the first visible signs of fruiting sixty days elapsed, and in sixty-eight days the life-cycle had been accomplished.

In another flask, on December 15, on bread moistened with sterilized water only, spores were deposited with a needle. The first incipient carpophores showed themselves on January 29. Six days later there was a fully developed fruit body. So that in this case the generation occupied only fifty-eight days.

In other cultures fruit bodies also appeared, but only one more will be specially mentioned here.

Cubes of beech wood were sterilized in the dry oven at a temperature of 165° C. They were inoculated on December 21 with a piece of mycelium taken from a culture in a Petri-dish on a jelly of meat and malt extract with agar. In two days a growth of flocculent white mycelium appeared around the inoculated section. This spread rapidly and covered the surfaces of all the blocks and bound them firmly together. After some time the mycelium in places assumed the orange hue already referred to in connexion with the Petri-dish cultures, and finally, after about five months, became blood-red in patches. Four carpophores arose in this flask, the first appearing on March 10. This gives 79 days from the inoculation, and 109 days from spore to spore. In this case the fruit bodies stood singly and not in clusters as is usual.

In order to ascertain the effect of desiccation on the mycelium, three pieces from the culture in which fructifications appeared on January 29 were taken out on the 27th (i. e. before any signs of fruiting had shown themselves) and were placed in an empty sterilized flask. Twelve days later several incipient fruit bodies were to be seen on each fragment. They were unable, however, to grow further and mature, apparently owing to insufficient nutriment. This seems to indicate that when the mycelium as a whole has reached the fruiting-stage it acquires a stimulus to form fruit bodies, which asserts itself under comparatively adverse conditions.

So as to give them more food the three pieces were eventually transferred on to a jelly of meat and malt extract. In a few days they all three started vigorous vegetative growth, and the jelly was soon completely liquefied. Though the whole surface became covered with mycelium, the incipient sporophores did not develop, but, on the contrary, gradually disappeared, and no signs of new ones presented themselves during the four months for which the culture was kept on. This, coupled with the fact that no fructification ever came up on any of the cultures on jelly, seems to show that such a substratum cannot afford the conditions necessary for the production of fruit bodies. No experiment, however, was carried out with more concentrated solutions than those described in the formulae.

The earliest traces of the carpophores are recognizable as diminutive conical protuberances above the surface of the felted mycelium (Fig. 17).

Usually these arise in clusters of a large number of individuals crowded together. In twenty-four hours, in vigorous growths, a small cap is already differentiated, the protuberances having elongated appreciably (Fig. 18). The increase in size and bulk goes on rapidly, and in three or four days the cap presents a very definite and separate structure ; the veil is already stretched out and transparent, allowing the gills to be seen through it (Figs. 19 to 22). In another two or three days the veil has separated off altogether from the edge of the pileus, which then begins to expand, first to a horizontal position, and finally its edges curl up so that the lamellae are exposed laterally (Pl. XXXVIII, Figs. 23 and 24). In another paper I have described the anatomical development of the fruit body (8).

Owing to want of space in these cultures and the consequent approximation of several fruit bodies, compound carpophores are liable to be formed in which three or four distinct ones agglomerate into a single stipe and pileus, the lines of union remaining recognizable.

In this crowded condition some of the sporophores may grow downwards (Fig. 19), though they never do so when space allows.

In one case the fruit bodies appeared as rounded instead of conical protuberances, and eventually had bulbous bases to their stipes (Fig. 25).

The average size of the artificially produced fruit bodies was considerably smaller than those found in nature ; in no case did the expanded pileus exceed two inches in diameter. The stipes, too, are rather more slender and elongated. As they were mostly grown in the dark, this was only to be expected. In this connexion a curious feature presented itself. All cultures grown in the dark produced pure white carpophores, which is the prevalent colouring in nature, whereas those grown in the light were invariably dark brown or, at least, a decided fuscous grey, turning somewhat lighter with maturity. Moreover, if when still young the culture was transferred from the light to the dark, or vice versa, the hue changed to that appropriate to the altered conditions. If the transfer was effected at a late stage, however, no appreciable change in tint was observable.

These facts may perhaps be taken to throw some light on the differences in colour noticed by the several authors in the naturally grown fructifications.

The fructifications reached maturity equally well when grown in the dark or in the light, but, on the whole, they were a little less robust when kept entirely in the dark and matured a little less rapidly.

There remains but one more culture to be given special notice. In a bulb flask a bread culture was made in the usual way, but was moistened with a 10 per cent. watery solution of glucose and a small quantity of 4 per cent. lactic acid. This was inoculated with a small piece of bread permeated with mycelium, taken from one of the cultures that eleven days later began to fructify. The inoculation was effected on January 18, and

the usual precautions to ensure purity were observed. It is important to note that in the parent culture no impurity presented itself at any time, and the subsequent development of normal carpophores of *A. mucida* in it demonstrated that the fungus growing actually was the one desired.

In two days growth from the inoculated section was perceptible, and was of the normal type of white mycelium. Before this had spread further than an inch, however, a new description of growth was seen. The flask had been kept in the light by a window, and a plate of smooth tissue of a light brown colour, rather of the hue of many of the fructifications developed in the light, projected itself above the surface of the mycelium. Other similar outgrowths appeared alongside the first, and it seemed as if the tissues producing the fruit bodies were unable to form the usual form of erect carpophores, but were giving rise to a series of folds standing out vertically from the surface (Fig. 26). The mass presented an appearance somewhat recalling that of a tremelloid fructification.

On microscopical examination it was found that the inside of the folds consisted of a palisade layer at right angles to its surface entirely resembling the basidial layer of the normal hymenium. Many spores of the normal shape were scattered about, but none connected with the basidia could be seen, nor even, at first, were any sterigmata to be found. After repeated cutting of sections, however, some sterigmata were seen, which in no particular differed from those of basidia on normal fructifications.

This abnormal growth progressed somewhat slowly, and very gradually spread over half of the available area. Meanwhile the mycelium grew out in the opposite direction, and from the latter, on April 8, the first indication of a normal carpophore came to light. Instead of being erect, however, it projected horizontally from the side of a cube of bread. By April 24 it had grown out to a length of $2\frac{1}{2}$ inches, with the distal $\frac{1}{2}$ inch swollen to a club. This swelling no doubt represented what should have been the cap, but actually no cap was differentiated. The stipe remained prostrate, and the swollen end rested on the bread, where it reverted to vegetative growth. At the base, however, and later on at the apex as well, a mass of incipient carpophores arose (Fig. 27). Some of these secondary fructifications attained a length of $1\frac{1}{2}$ inches, but none produced a cap visible to the naked eye. Sectioned with the microtome a differentiation into primordial pileus and hymenium could be distinguished. No further progress towards ripening a fully developed carpophore was made, and the fruit bodies drooped and degenerated. Some evidenced a tendency to produce tertiary fructifications a little below the apex (Fig. 28); eventually they also either degenerated or began to grow out into vegetative mycelium.

From all the above-mentioned facts it seems certain that the abnormal fructifications, extraordinary as it may seem, can only be very aberrant

resupinate forms of *Armillaria mucida*. Abnormalities of this nature are not altogether unknown in the case of other fungi.

It must be remembered that the inoculation was made from a culture that never showed any trace of impurity and produced normal carpophores, proving its identity. Also, the daughter-culture under consideration produced a mycelium of normal appearance, and on one part of it incipient fruit bodies which entirely resembled those of *A. mucida* appeared, though they failed to mature. Unfortunately, I was unable to separate out the spores from the abnormal fructifications so as to germinate them, nor could I obtain vegetative growth from pieces of the fructification in separate cultures.

In the normal carpophores it was observed that, as laid down by Fayod (7), the spore does not arise apically on the sterigma, but somewhat laterally, and only assumes the central position later on as it approaches maturity (Fig. 29 *a*, *b*, *c*).

Inoculations.

The experiments carried out to test for parasitic habit were of two descriptions: on living trees in the open and on living and dead twigs in the laboratory.

On November 27 a healthy branch about 2½ inches in diameter was selected on a sound beech tree, and two holes some eight inches apart were bored to its centre with a centre-bit, which had been previously sterilized by dipping it first in corrosive sublimate and then in absolute alcohol. Spores taken from a carpophore obtained in the neighbourhood were placed in one of the bore-holes only, the other being left intact. Both holes were closed with grafting-wax. A little further along the same branch a small wound just exposing the wood was made and was also infected with spores, and similarly occluded with wax. The branch was cut off on April 17, on which date it was quite healthy and full of sap. No infection had taken place at either of the points at which the spores had been placed. Spores were still adhering in a mass to the surfaces of the wounds; most had not even germinated, and those germ-tubes that had appeared had failed to effect an entry into the wood. The section of wood containing the inoculated bore-hole was put in a damp vessel on April 19. By June 5 it was found that hyphae had penetrated about 50 μ into the tissues, which though now dead were still full of moisture. The block was then placed in a dry jar. Sixteen days later, the wood being then comparatively dry, it was ascertained that the hyphae had penetrated much deeper and were far more abundant.

On January 11 two further inoculations were made on living beech trees. One rather slender branch on each of two healthy trees was picked out. In each case a twig was broken off so as to leave a jagged surface,

which was then inoculated with a piece of mycelium from a pure culture on bread, on which a carpophore had grown. The wound was bound up with a length of bast that had been previously sterilized in absolute alcohol, which was allowed to evaporate off before binding. As a control, neighbour twigs were also broken off but not inoculated. The twigs were removed on April 17 for examination. In one case there were no signs of infection; in the other the stub of the twig broken off, half an inch in length, was dead and discoloured throughout, and fungal hyphae could be seen to have penetrated to a depth of about one milimetre into the wood, but nowhere into still-living tissue.

Four beech plants five feet high and of a rather bushy habit were procured and planted out. One of them was inoculated in two places with sections of mycelium grown on bread—on the wound surface where a twig had been broken off, and on a cut on the stem. A control plant was similarly mutilated, but was not infected.

A third bush was grafted at two points with pieces of wood permeated with the hyphae of *A. mucida* taken out of a pure culture, and a control was cut in the same manner, but not grafted. All four inoculation spots were bound with bast steeped in alcohol, and were then smeared over with grafting-wax.

They were cut off on June 22, when it was found that no infection of living tissues had taken place. The stub left on breaking off a twig had died and was dry and discoloured, and in this alone had hyphae penetrated, but only as far as the point to which the tissues had died.

At the end of November some beech sticks, ¾ to 1 inch in diameter, were brought in from Windsor Park while still quite fresh and green. The cut ends were occluded with sealing-wax to hinder the evaporation of the moisture contained, and the sticks were inoculated with spores at places where the bark had been cut away sufficiently to discover the wood. They were then placed in a closed sterilized jar. On March 13 all were dead, no trace of green being revealed on incisions being made. One was cut up, but no signs of penetration by the hyphae could be detected. The remaining twigs were placed in a dish on moist earth, and on examination on May 22 were found to be grown through and through with hyphae.

Two other twigs, each with a side shoot and a bud attached, were inoculated with spores in incisions, and were placed in a jar of water. Early in February the buds had opened and fresh buds had formed, so that both twigs bore leaves, and consequently their tissues were still living. On March 16 one of the twigs had lost its leaves, and its tissues were found to be dead, but the leaves of the other were still fresh. In neither case had infection taken place. The inoculated spots of the dead one were then cut off, and the exposed surfaces were sterilized in the flame. The whole twig was then rubbed over with absolute alcohol, and after being allowed to dry

was reinoculated with pieces of mycelium from a pure culture, in incisions extending to the wood. It was then placed in a vessel of water standing in a stoppered jar. In a short time white mycelium in abundance appeared on the outside of the twig and soon spread around, attaching the twig to the side of the vessel. On microscopical examination it was ascertained that the hyphae had penetrated right to the centre of the wood, and no starch reaction was obtained with iodine (the fungus absorbs the starch, as will be seen later). In places the mycelium had found its way between the epidermis and the cortex, and had separated the two in waved lines, raising the epidermis in a blister-like manner.

The two last described experiments were repeated with the same results, which seems to show that the fungus is unable to effect an entry so long as a certain proportion of moisture in the wood is exceeded, with a corresponding lack of air. This is quite in accord with the results of Münch's researches with *Nectria ditissima*, *Cerastomella coerulea*, and other facultative wood parasites (18).

On sterilized thin unbarked beech twigs, mycelium inoculated from a pure culture grew very rapidly, entering the wood at the cut surfaces. An abundant dense, pure white mycelium overspread the twigs and extended all round and over the inside of the glass receptacle, and eventually it gave rise to two carpophores.

Deductions as to Parasitism.

We can now consider how all the experiments described above affect the question of the parasitic nature of *Armillaria mucida*. We have seen that attempts to grow the fungus as a parasite have failed, but on the other hand it was readily cultivable as a saprophyte on several nutritive media. It could also be grown on dead beech wood, on which it produced fructifications. In fact, the evidence so far available nowhere records the appearance of fruit bodies on living wood, though it is to be seen on dead parts of living trees. It is possible that it is a facultative parasite demanding specially favourable conditions to enable it to attack living tissues. It seems possible that it must first develop saprophytically and then, after a start, during which it has gained vigour, is able to enter upon a parasitic existence. These conditions would be secured at a point where a branch has broken off and the surface tissues have died from loss of moisture, but as yet we have no certain evidence in support.

It may be noted, also, that no one has recorded the occurrence of the fungus on young beech plants.

II. Action of the Fungus on the Tissues.

Methods.—In order to investigate the action of the hyphae on the wood of its host the following methods were employed.

Diseased wood brought in from Windsor Park was sawn into convenient sections and fixed in one of the following solutions :—

Merkel's solution.
Flemming's weak solution.
Absolute alcohol.
Picric acid.

Sections were cut freehand and tested with iodine, chlor-zinc-iodine, phloroglucin, alkalin, &c., and were stained by the methods detailed below.

At all stages sections of sound wood were treated in the same manner for comparison.

The stains employed were :—

Gentian violet and Congo red, as described by Biffen (1).

Ruthenium red and methyl green, first soaking in a solution of 75 per cent. alcohol and 25 per cent. hydrochloric acid and washing in 50 per cent. ammonia.

Safranin and Hoffmann's blue. With this stain after many trials the most satisfactory procedure was found to be the following: The sections were placed in safranin for fifteen minutes and then washed rapidly in 50 per cent. alcohol. They were then left in the Hoffmann's blue for from fifteen to twenty minutes and then washed in water. They were then passed rapidly up to absolute alcohol, and through xylol, and mounted in canada balsam.

Lastly, the diamant fuchsin and light green method was tried and gave the best results, especially for following the course of the hyphae in the tissues.

Disorganization of the Tissues.

The portions attacked can be recognized by the discolouration of the wood, which assumes a dark grey hue with the large medullary rays standing out unchanged (Figs. 30 and 31). Just as Biffen observed with *Bulgaria polymorpha* (1), the medullary rays seem to withstand the attack longer, but eventually they too succumb.

The hyphae apparently disintegrate after they have done their work, for where the wood had undergone considerable change (as described below), few or no hyphae were to be met with, whereas in places in which the hyphae were abundant the decomposition had hardly begun. This can be easily seen by comparing Figs. 32 and 33.

The tests applied showed that there was an early disappearance of the starch, followed by a gradual delignification of the secondary layers of the cell-walls of the wood. These layers become swollen and detached from the middle lamellae, and, owing to the want of space in the lumina in their expanded condition, they are curled up and contorted (Fig. 34). Gradually these disorganized tissues decompose and are absorbed by the hyphae, until only the middle lamellae are left (Fig. 33). In this state the wood is full of air and has become soft and lighter in colour.

The early stages tested with iodine or chlor-zinc-iodine gave no starch reaction. At a later stage with phloroglucin results similar to those obtained by Marshall Ward in the case of *Stereum hirsutum* (28) presented themselves. The middle lamellae stained a deep bright pink, the layers next to them were of a lighter pink, and the innermost swollen layers remained colourless, showing delignification from the lumen outwards. The cells of the medullary rays and of the wood parenchyma retained their lignin intact for a longer period, showing up in the advanced stages more or less bright pink in the midst of colourless fibres, vessels, and tracheids.

In the advanced stages the secondary layers of the cell-walls before their absorption gave a cellulose reaction with chlor-zinc-iodine, demonstrating the reduction to cellulose. This was too general and too complete to be referred to want of lignification as suggested by Potter (20); moreover, sound wood similarly tested gave no violet colour.

Evidence in the same direction was obtained with the gentian violet and Congo red stain. The lignified walls took on a blue stain, and those converted to cellulose coloured pink with the Congo red. The reactions, however, were not so very definite as the results obtained by Biffen.

With ruthenium red and methyl green the middle lamellae stained a cherry red, and the secondary layers either remained colourless, especially where much swollen and contorted, or took on a light green tint.

After the disappearance of the starch, products of decomposition of a brown colour are present in the cells of the medullary rays and of the parenchyma. Tested with ferrous sulphate they showed no trace of tannin, and the alkalin test betrayed no oil.

In the cubes of beech wood on which the mycelium had grown in pure culture, no structural change could be detected after two months, and no chemical alteration was revealed by the phloroglucin test. After the lapse of five months, however, the secondary walls were affected. With the diamant fuchsin and light green stains the structural changes described above for advanced stages of attack were verified; the detachment and partial disappearance of the secondary layers being evident.

The course of the hyphae in the wood can be followed in the sections stained with the diamant fuchsin and light green method (Fig. 35). This

stain colours the walls that are still lignified a light pink, with the middle lamellae standing out a darker shade, and the secondary layers remain uncoloured or stain green. The hyphae are stained olive green.

With safranin and Hoffmann's blue the host tissues are pink and the hyphae blue.

The hyphae may pass from cell to cell through the pits, but also bore their own way through the intact walls. The diameter of the hyphae varies considerably, ranging from 2 to 5 μ.

Pieces of a diseased branch that actually bore carpophores of *A. mucida*, and the wood of which was in an advanced stage of decay, were ground up into a powder, which was left to soak in 50 per cent. glycerine for about five weeks. In the filtrate obtained from this, small pieces of sound beech wood were immersed for $2\frac{1}{2}$ months. No structural change was visible, but treated with Schultz's solution, though the starch was found to be practically intact, there were distinct signs of delignification of the secondary layers of the cell-walls, which were stained a more or less deep violet to pale lilac, according to the degree of decomposition, with the middle lamellae yellow. In places, too, the secondary layers were detached from the middle lamellae and contorted, much as was the case in the diseased wood described above, though not to the same extent.

I feel justified, therefore, in concluding that the fungus secretes an enzyme, or enzymes, capable of reducing the starch and of reconverting the xylem to cellulose.

III. Remedial and Protective Measures.

Whatever the eventual conclusions as to the parasitic nature of *A. mucida* may be, it is certain that it causes serious detriment to beech timber, rendering it unfit for anything but fuel of a poor quality. It is possible that it is not a parasite at all, but it is none the less a foe of the beech forest and, like some other xylophile fungi, may require a preparation of the tissues by other organisms or by special conditions before it can avail itself of the nutriment they afford. Therefore, it is advisable to consider what precautions can be adopted to prevent its gaining an entrance into beech trees, and what can be done to eradicate it once it has established a footing.

The taking of active steps against fungoid diseases must ever be controlled by the question of cost. In maladies such as the one under consideration it too often happens that the necessary expenditure is out of proportion to the benefit to accrue. Nevertheless, it will be readily conceived that where beech is grown commercially this fungus, given suitable conditions, might inflict such losses that heavy expenditure on its eradication, and in subsequently protecting the forest against its inroads, would be

amply justified, and that failing drastic action some other species of timber tree would have to be grown in its place.

Prevention is better than cure, and in the case of small parks and avenues it is worth while to protect the trees against the entry of the disease. From its nature it is obvious that the fungus can enter a tree only by means of its spores, and these must alight on a wound from which the bark has been completely removed, so that they can reach the mature wood. Therefore, all wounds that give this opportunity should be promptly painted over with an antiseptic; one of the compounds of tar is most suitable. Tubeuf (27) has shown that the normal formation of wound tissue is not a sufficient protection, hence the necessity of an antiseptic which, of course, will also keep the wound secure from the attacks of other timber-infecting fungi.

Where the disease has established itself all diseased branches must be cut off and destroyed, and the exposed surfaces must be painted over as before. Care must be taken to cut off the limb at a point which will assure the removal of all trace of diseased tissue. For this purpose, where there is any doubt, the aid of the microscope should be called in.

This eradication may in some cases demand the sacrifice of the whole tree. As an attacked tree may live for many years, owners of ornamental parks may not be prepared to fell. In that case the tree must be kept under watchful observation, and the carpophores must be destroyed as soon as they appear and before they can ripen and shed their spores. This precaution, if strictly enforced, will preclude infection from diseased trees within the property, but will not insure against infection from outside by wind-borne spores. In any case decaying beech stumps or timber should on no account be left lying about, since the fungus may live saprophytically in the wood and develop its fruit bodies, and become a centre of infection.

When one remembers that a single spore may infect a tree, and that according to Buller's calculation (4) a single fruit body of *Polyporus squamosus*, 250 sq. centimetres in area, produces 11,112,500 spores, the importance of a careful watch for the appearance of the fruit bodies will be realized, if one desires to keep the trees free of the disease.

In forests of considerable extent such measures cannot well be applied. Here, the manager must content himself with removing, as far as possible, all diseased trees and stems exhibiting wounds at the periodical fellings. Also, felled timber must not be left lying in the forest. But these are the platitudes of Forest Science, and no stress need be laid on them here.

Summary.

1. *Armillaria mucida* can be grown saprophytically on various substrata: bread, dead beech wood and twigs, jellies of beer-wort, meat and malt extract, &c.

2. The spores germinate at once and abundantly in water and prune juice as well as on the above media.

3. The attempts to infect *living* beech wood failed, and no proof of its alleged parasitism can be preferred.

4. The time elapsing between the sowing of the spores to the ripening of the carpophores in pure cultures varied from 51 to 109 days.

5. The sporophores produced in the pure cultures were identical with those found in nature on beech trees, but the average size was considerably less, and the spores too were somewhat smaller, but were nevertheless fully capable of germination.

6. No secondary spore forms were obtained.

7. Clamp connexions were observed.

8. The fungus secretes enzymes which liquefy gelatine, dissolve starch, and reduce lignin to cellulose.

9. The products of decomposition contain neither tannin nor oil.

10. The preventive measures consist in occluding wounds on the trees with an antiseptic.

11. The remedial steps involve the removal and destruction of diseased parts and of the sporophores before they reach maturity.

I desire here to acknowledge the very great assistance I have received from Professors J. B. Farmer, F.R.S., and P. Groom, D.Sc., who suggested this research, and to express my sincere thanks for much kindly advice, many valuable suggestions, and a great deal of instruction tendered by them. My thanks are also due to Mr. M. Wilson, B.Sc., and to Mr. F. J. F. Shaw, B.Sc., for unfailing kind assistance. The latter gentleman also very kindly took the photograph reproduced as Fig. 23. Finally, I have to acknowledge the kindness of Dr. Somerville Hastings, F.R.C.S., who gave permission for the reproduction of two admirable photographs (Figs. 1 and 2) of *A. mucida*, which have already been published in Messrs. Gowans and Gray's excellent booklet 'Toadstools at Home'.

Literature.

1. Biffen: On the Biology of *Bulgaria polymorpha*. Annals of Botany, xv, 1901.
2. Brefeld, O.: Untersuchungen aus dem Gesammtgebiet der Mycologie, Heft viii, 1899, p. 54.
3. ————: Ibid., Heft xiv, 1908.
4. Buller, A. H. R.: The Biology of *Polyporus squamosa*. Journal of Economic Biology, i, part 3, 1906.

5. Cooke, M. C.: Handbook of British Fungi, 1871, p. 20.
6. ————: Fungoid pests of cultivated plants. 1906, p. 212.
7. Fayod, A.: Prodrome d'une histoire naturelle des Agaricinées. Annales des Sciences naturelles, 7e série, ix, 1889.
8. Fischer, C. E. C.: The Development of *Armillaria mucida*. Annals of Botany, July, 1909.
9. Frank, A. B.: Krankheiten der Pflanzen. 1880.
10. Fries: Systema mycologicum, i, 1821, p. 28.
11. Gautier: Les Champignons. 1884.
12. Gillot and Lucaud: Catalogue raisonné des champignons supérieurs. 1891.
13. Lambotte: Flore mycologique de la Belgique, i, 1880, p. 46.
Lucaud, Gillot and. Vide 12 supra.
14. Massee, G.: British Fungus Flora, iii, 1895, p. 23.
15. ————: A Textbook of Plant Diseases. 1889.
16. McIlvaine, C.: One thousand American Fungi. 1902.
17. Münch, E.: Die Form der Hausschwammsporen. Naturwissenschaftl. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft, v, No. 12, 1907, p. 616.
18. ————: Untersuchungen über Immunität und Krankheitsempfänglichkeit der Holzpflanzen. Naturwissenschaftl. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft, vii, 1909; no. 1, p. 54; no. 2, p. 87; no. 3, p. 129.
19. Patouillard: Tabulae analyticae fungorum, 1886, p. 181.
20. Potter, M. C.: Cellulose in the xylem of woody stems. Annals of Botany, xviii, 1904.
21. Prillieux, Ed.: Maladies des Plantes Agricoles. 1897.
22. Rabenhorst: Kryptogamen-Flora, Band i, Abth. 1, p. 829.
23. Saccardo: Sylloge Fungorum, v, p. 85.
24. Schrader: Spicilegium Florae Germanicae. 1794.
25. Sorauer, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, ii, 1906, p. 393.
26. Tubeuf, C. von: Pflanzenkrankheiten. 1895.
27. ————: Ueber normale und pathogene Kernbildung etc. Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen, 1889.
28. Ward, H. Marshall: Biology of *Stereum hirsutum*. Transactions of the Royal Society, clxxxix, 1897.

EXPLANATION OF PLATES XXXVII AND XXXVIII.

Illustrating Mr. Fischer's paper on *Armillaria mucida*.

Figs. 1, 2, and 24 are from photographs. Figs. 3 to 16, 29 *a*, *b*, *c*, and 32 to 35 from drawings by the author with the camera lucida. Figs. 17 to 23, 25 to 28, 30 and 31 from freehand drawings by the author.

PLATE XXXVII.

Figs. 1 and 2. *Armillaria mucida* on beech. Photographs by Dr. Somerville Hastings, F.R.C.S. 1 × $\frac{1}{10}$: 2 × $\frac{1}{2}$.

Fig. 3. Collapsed, boat-shaped dry spores. × about 475.

Fig. 4. Turgid spherical spores. × about 475.

Fig. 5. Spores from fruit body grown in pure culture. × about 475.

Fig. 6. Germinating spores. × about 260.

Fig. 7. Section from stipe putting out new hyphae in jelly. × about 100.

Fig. 8. Germ tube and vegetative growth from basidium. *a*. Germ tube from spore; *b*, much branched hypha from basidium. × about 475.

Fig. 9. Multi-septate hypha grown out of a basidium. × about 475.

Fig. 10. Hypha in moist jelly. × about 100.

Fig. 11. Hypha in drying jelly. × about 100.
Fig. 12. Hypha in jelly. × about 300.
Fig. 13. Curled hypha in jelly hanging drop. × about 400.
Fig. 14. Clamp connexion. × about 700.
Fig. 15. Clamp connexion on a hypha from a basidium. × about 475.
Fig. 16 *a*, *b*, *c*. Hyphae breaking up into rods—*oidia*? × about 475.
Fig. 17. Group of incipient carpophores on bread. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 18. The same 24 hours later. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 19. The same 24 hours older than Fig. 18. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 20. The same 48 hours older than Fig. 19. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 21. The same 24 hours older than Fig. 20. × about $\frac{1}{4}$.

PLATE XXXVIII.

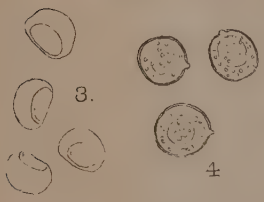
Fig. 22 *a* and *b*. The same carpophore as in Fig. 21, 24 hours later. Veil much stretched. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 23. Mature carpophore. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 24. Group of carpophores grown on a pure culture of bread. × about $\frac{1}{4}$. Photograph kindly taken by Mr. J. F. J. Shaw, A.R.C.S.
Fig. 25. Young carpophores grown in the light; dark brown with bulbous bases. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 26. Abnormal resupinate fructification. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 27. Aberrant undeveloped prostrate carpophore with secondary carpophores arising on basal portion of stipe. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 28. The same 30 days later. Secondary carpophores arising at apex, and indications of tertiary ones near apex of two of the secondary carpophores. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 29 *a*, *b*, *c*. Basidia showing sterigmata and development of spores. × about 475.
Figs. 30 and 31. Discoloration of wood. × about $\frac{1}{4}$.
Fig. 32. Hyphae in the vessels, cell-walls as yet but little affected. × about 475.
Fig. 33. Advanced stage of attack, hyphae have disappeared and practically middle lamellae only remain. × about 475.
Fig. 34. The secondary layers of cell-walls detached from middle lamellae and swollen and contorted. × about 360.
Fig. 35. Hyphae in cells of large medullary ray. × about 475.

Imperial College of Science and Technology,
South Kensington,
June, 1909.

1.

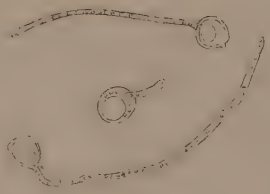
2.

8



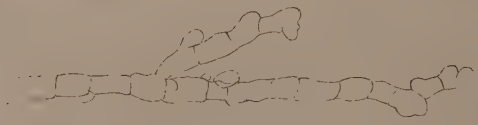
3.

4

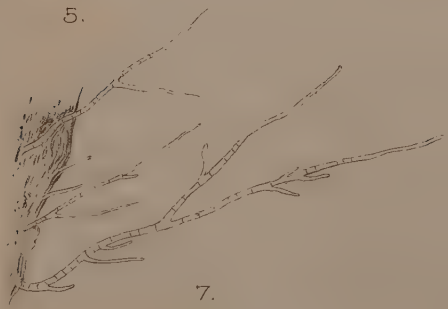


6.

5.

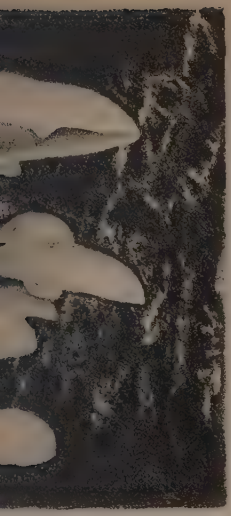


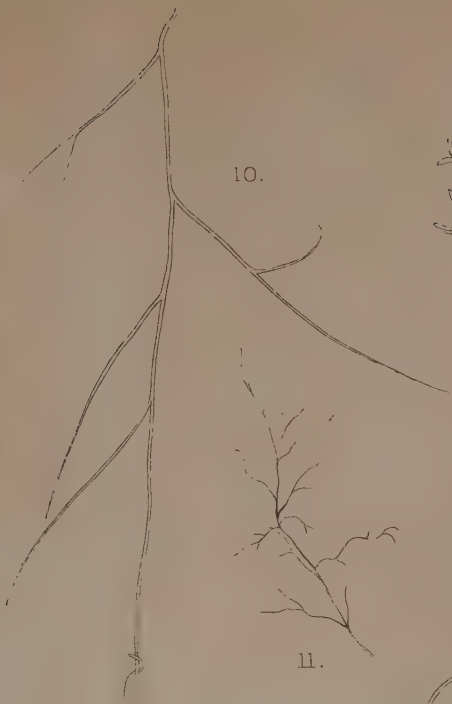
9.

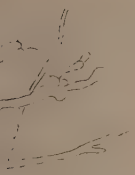


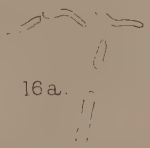
7.

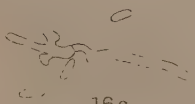
19

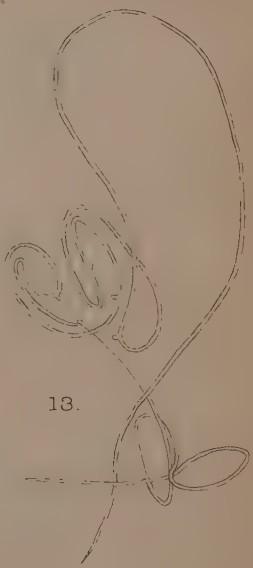




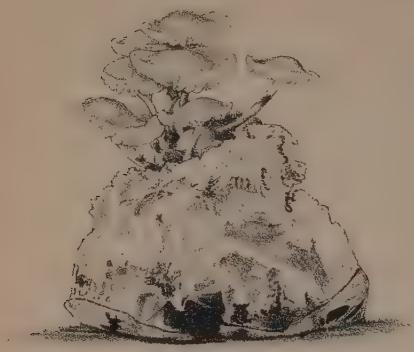






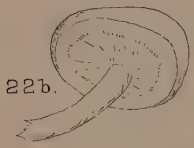


Huth, lith et imp.

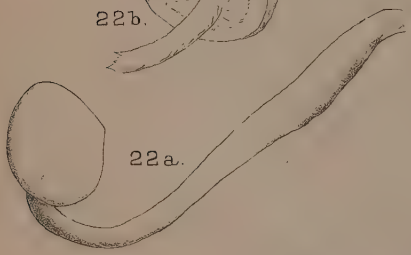


24.

23.



22b.



22a.

25.

29a.

26.

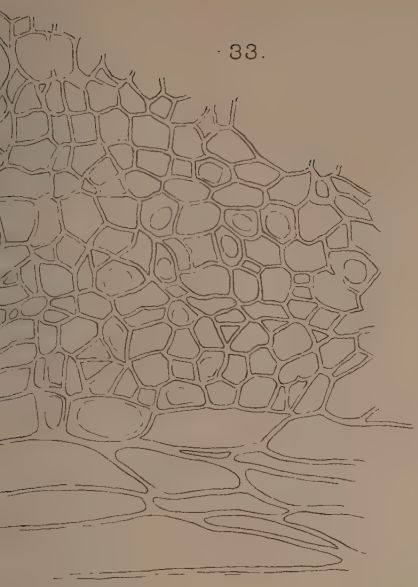
30.

29b.

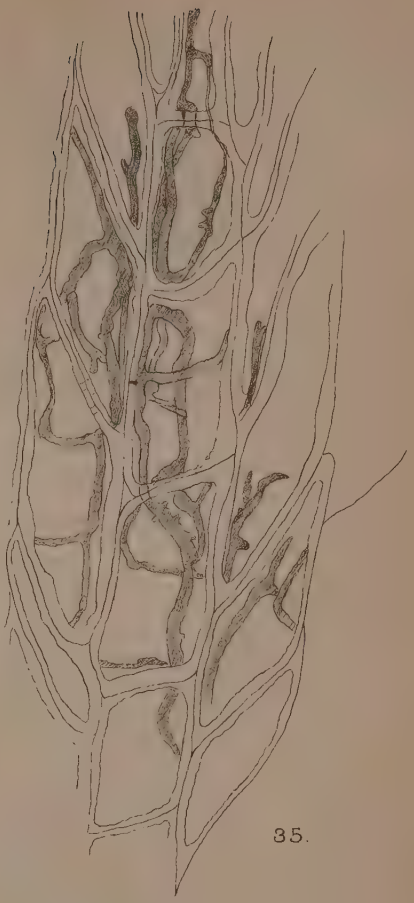
29c.

31.

28.

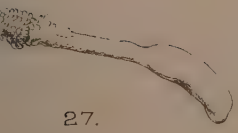


33.



35.

34.



27.

32.

Huth, lith et imp

Researches on the Life-history of Parasitic Fungi.

BY

C. K. BANCROFT, B.A.

Formerly Major Scholar of Trinity College, Cambridge.

With Plate XXIV.

I. Cladosporium herbarum, Link.

THE genus *Cladosporium* is a comparatively old one, having been founded by Link in the year 1791. The species *Cladosporium herbarum* was described by the same observer in the following terms:—'atrovirens, densum, effusum, floccis septatis.'

The species is of somewhat wide occurrence; almost everywhere the dead remains of plants can be seen to be covered with dark, sometimes almost black patches formed of its conidiophores. The conidiophores are olive and are arranged in tufts which are frequently large and dense. The conidia are olive, continuous at first and becoming later typically once septate; they measure on the average 18–20 × 8–10 μ, and are produced at the tip of the conidiophore in short chains which sometimes remain attached so that they may become larger and twice or even thrice septate. *Cladosporium herbarum* in its life-history will be shown to be connected with another conidial form belonging to the form-genus *Hormodendron*; this form *Hormodendron* will be shown to be parasitic on several plants, causing disease, and it is proposed first to treat with this disease and after to deal with the relations of the conidial form to *Cladosporium herbarum*.

The disease caused by the form Hormodendron and the evidence of its parasitic nature.

For some time past the green foliage of many different species of plants has been seen to be suffering with a disease which takes the form of large, irregular holes in the lamina of the leaf. The damp summer of last year seems to have been particularly favourable to the spread of the disease. Of the species which have frequently been found to be affected in this way the following are given:—

Brassica oleracea (Cabbage), *Cucumis sativa* (Cucumber), *Cucumis Melo* (Melon), *Arctium Lappa* (Burdock), *Catalpa bignonioides*, *Althaea rosea*,

[Annals of Botany, Vol. XXIV. No. XCIV. April, 1910.]

Malva sylvestris, *Circaea lutetiana* (Enchanter's Nightshade), *Funkia* spp., *Digitalis purpurea* (Foxglove), and *Phlox* spp.

Since it attacks such plants as Cucumber, Melon, and Cabbage, the fungus is one of economic importance; the assimilating surface of plants attacked may be considerably reduced, and further, in the case of Cabbage, the disease may render the 'heads' quite unsaleable. At times the disease has taken the form of an epidemic in Cucumber houses in this country. When a leaf is attacked small perforations make their appearance; these increase in size and frequently run together so that they eventually become large, irregular holes. The largest holes which have been recorded measured about three-fourths of an inch. Surrounding each hole there is usually a small, brownish area formed of the dead tissues of the leaf; the remaining parts appear to be green and healthy. Along with the rest of the tissues the smaller veins perish; the larger veins, however, as a rule remain. It is interesting to note that in its progress this disease differs markedly from the so-called 'leaf-spot' diseases; in the latter the tissues of isolated spots are killed and fall away, leaving holes in the leaf, whereas in the former the tissues appear to be eaten away and the holes continue to increase in size. An examination of the tissues of the leaf bordering on the hole shows that the cells are apparently exhausted of their contents and dried; it might be thought that the formation of the holes and their increase in size were due to the falling away of these dead cells, but this is apparently not so in this case. From the very commencement of the disease a perforation appears, not a dried spot from which the dead tissues fall away leaving a hole; in fact, it seems as if the tissues of the leaf are not merely killed but devoured. This mode of action is most unusual for a fungus and resembles that of an animal; it would point to the occurrence of ferments of the cytase, protease, and diastase classes, and it is hoped that further work on the ferments present in this parasite will throw some light on its action on the tissues of the leaf.

The mycelium of the fungus is most abundant in that region which is in close proximity to the holes; further away from the holes the tissues contain little or no mycelium. The hyphae run through the cells; they are colourless when young, become darker in colour as they grow older, are variously branched, measure about 4 μ in width, and are without haustoria. The conidiophores arise from the hyphae in the tissues of the leaf bordering on the holes; they are short, lateral branches of the hyphae, are simple, almost hyaline, continuous or sparingly septate, and bear at their tips branched chains of conidia. The branched chain arises thus:—from the tip of the conidiophore three conidia are usually formed; each of these bears two conidia of a second order, and each conidium of the second order can bear one or two of a third order of branching, and so on. The conidia are hyaline or almost hyaline, continuous, elliptical, and measure 8–9 × 4 μ.

From the structure and arrangement of the conidia the fungus was found to correspond with the form-genus *Hormodendron*.

An account will now be given of the infection experiments which show that the form *Hormodendron* is the cause of the disease described above. Before actually carrying out the infections a pure culture of the fungus was made in order to ensure the exclusion of any spores other than those of the form *Hormodendron*. First, some of the conidia were taken from an infected leaf of *Catalpa bignonioides* and were transferred to pure water in a 'hanging-drop'; they were thus kept in water in a chamber which was constantly moist. In from one to two days they were found to have germinated. Each emitted one hypha, as a rule, which became septate and branched; the absence of food-material prevented any further growth of the hyphae. A cultural medium composed of 4 per cent. of the expressed juice of fresh grapes and 6 per cent. of gelatine was found to be favourable to the growth of the fungus. This nutrient gelatine was sterilized by heating in a steam-oven for four hours each day on three successive days. Five Petri dishes and a boiling-tube, into which a plug of cotton-wool had been inserted so as to close its mouth, were sterilized by heating in an air-oven at 100° C. for five hours each day on two successive days. Some of the nutrient gelatine was transferred to the boiling-tube, and to this were added some conidia taken from a previously made, impure culture; the needle used for transferring the conidia had been previously heated to a red heat and allowed to cool. The liquid in the boiling-tube was shaken, and some of it was poured into a Petri dish. The remainder of the liquid in the boiling-tube was then diluted by one-half, it was shaken and some was transferred to another Petri dish; this process of diluting, shaking, and transferring some of the fluid to a Petri dish was repeated three times. Care was taken to keep the boiling-tube closed as much as possible, and before removing the plug of cotton-wool the part of the plug which was exposed to the air was slightly burnt on each occasion so as to prevent any spores which had fallen on it from the air from dropping into the liquid in the tube. The last Petri dish was found to contain a pure culture derived from the growth of a single conidium. The growth and development of the mycelium in the pure culture was carefully followed. The hyphae when young were colourless, but as they grew older they assumed an olive colour; they were septate at fairly short intervals and were variously branched. From them there arose abundant lateral branches which grew above the surface of the nutrient gelatine and bore branched chains of conidia. The conidia in their structure, mode of formation, and arrangement corresponded with those observed on the infected leaves and described above.

Conidia taken from the pure culture were used for infecting living plants. Two methods were made use of for transferring them to the leaves;

in the one a sterilized needle was used, in the other they were mixed with sterilized water in a spraying-apparatus which had been previously washed out with absolute alcohol and allowed to dry. Six young Cabbage plants were selected as being healthy and intact and were arranged in two lots of three each. In one experiment the leaves of three plants were sprayed with the conidia; in the other experiment the conidia were transferred to definite spots on the leaves of the other three plants and the spots were moistened with distilled water. Each lot of three plants was covered with a bell-jar of which the inner surface had been cleaned with absolute alcohol. In from four to five days the leaves thus treated were found to have perforations in them; the leaves of those plants which had been sprayed showed numerous perforations, while in the others the perforations were limited to the spots on which the conidia had been placed. The perforations increased in size and soon became large holes. A microscopic examination showed that the conidiophores of the fungus were arising from the tissues of the leaf surrounding the holes and were producing conidia abundantly. The symptoms developed by these plants which had been artificially infected were similar to those observed naturally on the infected plants. All of the six plants yielded the same results, while a control in the form of a young Cabbage plant kept under a sterilized bell-jar and to which no conidia had been transferred showed no signs of infection.

Another series of experiments was made for the purpose of determining with what degree of facility the fungus could be transferred from one host to another. For this purpose excised leaves were used; the leaves were placed on filter papers in Petri dishes and the filter papers were moistened with distilled water, the Petri dishes and filter papers having been previously sterilized by heating in an air-oven at 100° C. for five hours each day on two successive days. Conidia were taken from an infected leaf of one species and were placed on definite spots of a leaf of another species in the Petri dish; the spots were moistened with distilled water. The experiments showed that conidia from one species would grow on another with apparent facility. The fungus on Cabbage could be transferred to *Catalpa*, that on Melon to Cabbage and vice versa, that on *Catalpa* to Mallow and vice versa, and that on *Catalpa* to Melon. It is concluded that the form *Hormodendron* has not adapted itself closely to any one host, at least in the case of the species experimented with. Further, it may be mentioned that the disease caused by this form would be particularly difficult to exterminate, since the fungus attacks many species of plants and can apparently pass from one species to another, and this apart from its connexion with *Cladosporium herbarum*, which is so common everywhere on the dead leaves of plants.

The origin of Cladosporium from Hormodendron.

An examination of the old cultures of *Hormodendron* showed that the production of conidia of *Hormodendron* had ceased. The mycelium remained the same, but from some of the hyphae lateral branches had been produced which bore pale olive conidia at their tips. These fertile hyphae were thicker than those which had borne conidia of *Hormodendron* and were three or four times septate. The conidia were borne in short chains and were typically once septate; sometimes they were twice or thrice septate. They were similar in their structure and mode of origin to those of *Cladosporium herbarum*. Some of them were seen to have germinated in the medium of the culture; each emitted two hyphae, as a rule, which were septate at somewhat short intervals and were usually unbranched. At the tips of the hyphae were borne short chains of conidia of *Cladosporium*. The examination of the cultures, therefore, showed that the mycelium of *Hormodendron* after having produced conidia of *Hormodendron* gave rise to conidia of *Cladosporium*, which after germination in the medium of the culture reproduced themselves.

The production of Hormodendron from Cladosporium.

The origin of *Cladosporium* from *Hormodendron* shown above led to a careful examination of the leaves of plants which were attacked by *Hormodendron*, for the purpose of finding out whether *Cladosporium* occurred on them. On the living leaves no *Cladosporium* was observed, but the waning or dead leaves showed *Cladosporium* to be present in abundance. Whereas from these leaves *Hormodendron* had evidently disappeared, tufts of the conidiophores of *Cladosporium* could be seen growing around the holes previously made by *Hormodendron* as well as on other parts of the leaves which showed no signs of having been affected with *Hormodendron*. The dead or waning leaves of all the species which had been attacked by *Hormodendron* showed *Cladosporium* on them.

Conidia of *Cladosporium* were taken from the leaves and were mounted in 'hanging-drops' in a weak solution of cane sugar. Whether they were continuous or once, twice, or thrice septate the conidia were found to be capable of germinating; it is, therefore, interesting to note that the mature conidium is not necessarily septate, that is if the power of germinating is to be taken as the significance of maturity. Each conidium emitted usually two hyphae; the hyphae grew, branched, and on the lateral branches were borne branched chains of conidia of *Hormodendron*. Sometimes a hypha was observed to bear conidia of *Hormodendron* when quite short and unbranched. The results of the germination of conidia of *Cladosporium* taken from different species of plants were the same; in the experiments conidia of *Cladosporium* were taken from the leaves of Cabbage, Oak, *Catalpa*, *Funkia*, Melon, and other plants.

The action of different media was tried for the purpose of ascertaining whether the composition of the medium in which germination took place would have any effect on the production of conidia of *Hormodendron*. The following media were employed:—

1. Distilled water.

2. A solution of mineral salts in water consisting of equal weights of potassium phosphate, calcium chloride, and magnesium sulphate, and amounting to 2 per cent. total salts.

3. A 2 per cent. solution of pure cane sugar.

4. A decoction of dried leaves of *Catalpa* and Cabbage made by grinding the leaves in a mortar with the addition of a little water, filtering through muslin and adding more water to make up to a 4 per cent. solution of the expressed juice of the leaves. In these media the germination of conidia of *Cladosporium* taken from leaves of Cabbage, *Catalpa*, Oak, and *Funkia* was carried out in 'hanging-drops'. It was found that whatever medium was employed the same result attended the germination of the conidia, viz. the formation of conidia of *Hormodendron*.

The conidiophores and the small masses of cells produced by the mycelium of *Cladosporium* were also found to be capable of giving rise to conidia of *Hormodendron*. When some of the conidiophores of *Cladosporium* were mounted in a 'hanging-drop' in a 2 per cent. solution of cane sugar it was found that occasionally from the broken end of a conidiophore there arose a hypha which branched, and at the tips of the branches were borne conidia of *Hormodendron*. The small masses of cells produced by the mycelium of *Cladosporium* were also found to be capable of giving rise to hyphae which bore conidia of *Hormodendron*.

These experiments showed that not only can conidia of *Hormodendron* be produced by *Cladosporium*, but also that there is a great tendency on the part of *Cladosporium* to give rise to conidia of *Hormodendron*, and that this tendency has made itself manifest, in the case of the species of plants used as the source of *Cladosporium*, independently of the nutrient medium employed for germination.

By making use of the method described above for the preparation of a pure culture, it was found possible to obtain a pure culture of *Cladosporium*. The medium used consisted of 4 per cent. of the extracted juice of fresh grapes and 6 per cent. of gelatine. In the pure culture the growth and development of the mycelium were followed. The hyphae were at first colourless and became later olive in colour. The general nature and appearance of the mycelium and of its component hyphae were similar to those of the mycelium and hyphae in the cultures of *Hormodendron* described above. From the hyphae there arose lateral branches which grew above the surface of the nutrient gelatine and produced conidia of *Hormodendron*. The production of conidia of *Hormodendron* was not

abundant, and was much less than in the cultures of *Hormodendron*. Soon conidia of *Cladosporium* began to be formed; they were found to arise in a similar way to those described above in the cultures of *Hormodendron*. On germination these conidia gave rise to conidia of *Cladosporium* again.

The following conclusions are based on the comparison of the cultures of *Cladosporium* and *Hormodendron*:—the characters of the mycelium and of the component hyphae are similar in both cases; there is a production of conidia of *Hormodendron* which is more abundant in the latter case than in the former; this is followed in both cases by the formation of conidia of *Cladosporium*, and these conidia of *Cladosporium* on germination reproduce themselves; of the two conidial forms, *Cladosporium* and *Hormodendron*, each can give rise to the other and each can also reproduce itself; the tendency on the part of *Hormodendron* in an artificial matrix to pass to *Cladosporium* is clear.

The effect of a lower temperature on the germination of conidia of Cladosporium.

In the experiments described above, in which 'hanging-drops' were employed, the conidia of *Cladosporium* had been germinated at the temperature of the laboratory, i. e. at 60° F. and above, and it has been shown that they always gave rise to conidia of *Hormodendron*. Further experiments were conducted for the purpose of ascertaining whether a lower temperature would in any way influence the formation of conidia of *Hormodendron*. The hosts used were Cabbage, *Catalpa*, and *Funkia*; one or two conidia from each were mounted in a 'hanging-drop' in a 2 per cent. solution of cane sugar. The 'hanging-drop' cultures were placed on a box outside of the building, and near to them were placed a maximum and a minimum thermometer. During the space of five days the thermometer recorded the following temperatures:—

Date.	*Maximum Temperature.*	*Minimum Temperature.*
November 10	49° F.	35° F.
,, 11	50° F.	32° F.
,, 12	55° F.	33° F.
,, 13	54° F.	30° F.
,, 14	56° F.	31° F.

The highest temperature attained was 56° F. on the last day, and the lowest temperature was 30° F. on the fourth day; the average temperature for the five days was 42° F. All of the conidia germinated, and each gave rise to hyphae which were septate at somewhat short intervals, were sparingly branched, and bore conidia of *Cladosporium*. In some cases not only were the conidia borne at the tip of the hypha, but the hypha became converted

into a chain of conidia. Other 'hanging-drop' cultures were prepared as controls, and were kept at the temperature of the laboratory; in these the production of conidia of *Hormodendron* was found to take place in the ordinary way. At the lower temperature, then, the formation of conidia of *Hormodendron* was completely suppressed.

The microsclerotia of Cladosporium; their growth and development.

Each tuft of conidiophores of *Cladosporium* springs from a cellular mass produced by the approximation and repeated division of the hyphae. When the conidiophores fall away this mass of cells remains and forms what has been called a microsclerotium. The microsclerotium is somewhat rounded and measures, when fully formed, about 160 μ across. Its surface is corrugated, and there can be seen projecting from the main mass a few outlying cells which are more or less transparent. The main mass of the microsclerotium is black or of a very dark brown colour, and is composed of cells which are more or less rounded, dark brown in colour, and have rather thicker walls than the hyphae from which they were formed. It is conceivable that the microsclerotia do not necessarily always arise at the base of a tuft of conidiophores; the hyphae in the tissues, in their later stages at any rate, show a tendency to form masses of cells, and these probably also develop into microsclerotia. The microsclerotium is regarded as a resting-stage of *Cladosporium*, or rather as a stage which is capable of enduring a period of inactivity.

The growth of microsclerotia taken from leaves of Oak, *Catalpa*, Cabbage, *Funkia*, Plantain, and other plants, was observed; they were allowed to germinate in 'hanging-drops' in water. Each superficial cell by the rupture of its thick wall was found to be capable of emitting a hypha; the hypha grew, became septate, and seldom branched. From its tip there arose a short chain of conidia of *Cladosporium*. The microsclerotium was thus seen to be capable of producing conidiophores which bore conidia of *Cladosporium*, and this was found to occur in the case of all of the species of plants used. Some of the smaller masses of cells had been seen, as was stated above under the section dealing with the origin of *Hormodendron* from *Cladosporium*, to give rise to conidia of *Hormodendron*, but these are not regarded as fully formed, true microsclerotia.

Some of the conidia of *Cladosporium* derived from microsclerotia were germinated in 'hanging-drops' in a 2 per cent. solution of cane sugar; they were found to give rise to conidia of *Hormodendron*. This was observed in the case of conidia produced by microsclerotia which had been taken from all of the species mentioned above. It is, therefore, concluded that this is the means by which *Hormodendron* is naturally regenerated in the spring.

Before discussing the relations of the two conidial forms, *Cladosporium* and *Hormodendron*, to each other, it may be well to describe briefly the experiments which were conducted on the infection of living leaves with conidia of *Cladosporium*. For this purpose excised leaves were used, and the experiments were conducted in a similar way to those described above in which the leaves were placed on filter papers in Petri dishes, and the conidia transferred to definite spots on them by means of a needle. The conidia were taken from the leaves of *Catalpa* and of Cabbage. After four days an examination of the spots showed that conidia of *Hormodendron* were being produced; later on, the leaves died and commenced to rot, and the conidia of *Hormodendron* ceased to be formed; conidia of *Cladosporium* were then found to be present in abundance. The infection of the leaves of Cabbage and *Catalpa* yielded similar results, and led to the following conclusions :—

Conidia of *Cladosporium* placed on living leaves give rise to conidia of *Hormodendron* which are capable of infecting living leaves; direct infection by conidia of *Cladosporium* is not possible when the leaves are living; when the leaves die, *Hormodendron* disappears, and *Cladosporium* then makes its appearance.

The relations of Cladosporium and Hormodendron to each other and the nature of the life-cycle.

It has been shown above that if healthy leaves are infected artificially with conidia of *Hormodendron*, they develop symptoms of disease which are similar to the symptoms observed in the case of leaves which have been infected naturally with *Hormodendron*. It is, therefore, concluded that *Hormodendron* is capable of living as a parasite on the green leaves of plants and of causing disease.

Hormodendron attacks many plants which exhibit no close relationship to each other; in its range it is not confined to species of one family or even of closely allied families, and it can be transferred from one species of host to another without any difficulty. This shows that it is only weakly parasitic, in the sense that it represents no highly developed form of parasitism.

The cultural experiments have shown that the same mycelium which had previously formed conidia of *Hormodendron* gives rise later to conidia of *Cladosporium*, while observations on the leaves of plants attacked by *Hormodendron* in nature have shown that when the leaves commence to wane and die *Hormodendron* disappears, and *Cladosporium* makes its appearance. It is inferred that *Cladosporium* occurring on waning or dead leaves has its origin from *Hormodendron* which attacks the leaves when they are living. Also, since on the dead leaves *Hormodendron* passes

to *Cladosporium* and the same change occurs in an artificial medium, *Hormodendron* is considered to require a living matrix for its further continuance.

The occurrence of *Cladosporium* on dead leaves, its production in an artificial, cultural medium, and its tendency to reproduce itself in such a medium show that it is to be regarded as a saprophytic form. In the life-history of many fungi when two forms are concerned, the one a parasite and the other a saprophyte, it is customary for the saprophytic form to be ultimately produced in an artificial medium and to continue to reproduce itself in such a medium. In the genus *Ustilago*, for example, the secondary spores produced by the so-called *Ustilago*-spores continue to reproduce themselves in an artificial medium, and it is only when they are transferred to the host-plant that they give rise to the parasitic form from which the *Ustilago*-spores are again produced.

Conidia of *Cladosporium*, when germinated at a temperature of 60° F. or above, give rise to conidia of *Hormodendron*. This is considered as a means by which *Hormodendron* is produced for the purpose of infecting living leaves during the summer; there are, then, two sources from which *Hormodendron* is derived during the summer, namely, conidia of *Cladosporium* and conidia of *Hormodendron*. A lower temperature has been shown to suppress the production of conidia of *Hormodendron* and to favour the formation of conidia of *Cladosporium*. This points to *Hormodendron* being a summer form and to *Cladosporium* being a later form.

The fully formed microsclerotia have been shown to produce conidiophores which bear conidia of *Cladosporium*, and these conidia of *Cladosporium* have been shown to give rise to conidia of *Hormodendron* after germination. This is considered to afford the means by which *Hormodendron* is regenerated in the spring of each year. The microsclerotia are formed in late autumn, after the conidiophores of *Cladosporium* have disappeared, and exist through the winter in a state of inactivity. On the recurrence of spring they germinate to give rise to conidia of *Cladosporium*, from which conidia of *Hormodendron* are produced, and so can infect the living leaves of plants during the summer.

From the experimental results and from the conclusions based on them, the life-history of *Cladosporium herbarum* is considered to include two conidial forms, the one a parasitic form, *Hormodendron*, and the other, *Cladosporium*, a saprophytic form. The latter form is capable of existing in an inactive condition through the winter. Such a life-history, which is made up of two conidial forms only, is unusual among the Fungi. Each form has been shown to be capable of giving rise to the other, and an attempt has been made to elaborate the conditions under which one form tends to pass into the other. The life-cycle appears to be complete, and the intervention of any other spore-form would be unnecessary.

The species of *Cladosporium* dealt with in this article has been regarded as *Cladosporium herbarum*; hitherto it has been customary to regard the species occurring on *Quercus*, *Platanus*, *Populus*, and a few others, as *Cladosporium epiphyllum*, Nees, and that occurring on the dead remains of plants generally as *Cladosporium herbarum*, Link. It is considered to be advisable to include these two hitherto distinct species under one specific name, partly because the differences in the nature of the conidia and conidiophores are not thought to be sufficiently great to warrant their separation as two distinct species, and also because the conidia taken from *Quercus*, or from any of the other species of plants worked with, have yielded similar results; the name of the older form, *Cladosporium herbarum*, Link, is accepted as the name of the species.

Previous work on Cladosporium herbarum.

Cladosporium herbarum has afforded material for the work of several authors; reference will now be made to a few of these. M. Janczewski obtained a giant and a dwarf form of *Hormodendron* from *Cladosporium herbarum*; the same observer has also obtained an ascigerous stage which he has named *Sphaerella Tulasnei*. M. Laurent obtained *Hormodendron cladosporioides*, Sacc., *Dematium pullulans*, De Bary, and a *Fumago* form, all being forms of *Cladosporium herbarum*. M. Berlèse, on germinating conidia of *Cladosporium herbarum* taken from a number of species of plants, always obtained the form *Hormodendron*, which he regards as essentially the saprophytic form of *Cladosporium herbarum*. Other observers have obtained several other forms.

In the life-history given above the only other form mentioned is the form *Hormodendron*; this was the only other form obtained in the cultures or observed on the leaves of plants examined, except in one instance which will now be mentioned. On germinating conidia of *Cladosporium* taken from the leaves of *Eucalyptus globulus* in a 2 per cent. solution of cane sugar in 'hanging-drops', there was produced, in addition to the small form *Hormodendron*, a larger conidial form of which the conidia measured $18 \times 8\,\mu$. The conidia were borne in branched chains not only at the apex of the conidiophore, but also at other points of its axis. In their method of origin, therefore, the conidia of the larger form differed from those of the small form which were borne only at the apex of the conidiophore. In both the smaller and larger forms, however, the conidia differed somewhat from those of the form *Hormodendron* occurring on other species of plants, in that instead of being elliptical they were nearly circular in shape. It must be borne in mind that *Eucalyptus globulus* is an exotic species, and more work is needed to determine whether the species of *Cladosporium* occurring on it is a different species from *Cladosporium herbarum*.

The work of the authors mentioned above would show that *Hormodendron* is a saprophytic form, while the experiments described in this article would point to its being a parasitic form. With reference to the ascigerous stage, *Sphaerella Tulasnei*, mentioned above, it may be said that there is no record of its occurrence in Britain, and, further, that the life-history of *Cladosporium herbarum* has been shown to be complete without the intervention of an ascigerous stage.

Cladosporium herbarum has been described by several observers as, in certain circumstances, a parasite. Prilleux and Delacroix consider it to be parasitic on Apple trees and Raspberry bushes, Cavara on Raspberry, Cycads, and other plants, Sorauer on Peas, Lopriore on Wheat, and Ritzema Bos on Oats.

On the whole the work of various authors tends to show that there are several races or species included under the name *Cladosporium herbarum* which are separated from each other, not by the characters of conidia, conidiophores, or hyphae, but by virtue of the other spore-forms which they can give rise to.

The following is given as a brief summary of the life-history as worked out in the above pages :—

1. The life-cycle is composed of two conidial forms, *Hormodendron* and *Cladosporium*.

2. *Hormodendron* is a parasitic and summer form ; in the summer it produces a disease of the green leaves of several species of plants. When the leaves die it passes to the other form, *Cladosporium*.

3. *Cladosporium* is a later form and exists as a saprophyte on the dead leaves which have been previously attacked by *Hormodendron*. It can give rise to *Hormodendron* if the temperature be moderately high ; but at a lower temperature it reproduces itself.

4. In the winter *Cladosporium* exists in the form of microsclerotia which on the advent of the spring germinate to produce conidia of *Cladosporium* ; these conidia of *Cladosporium*, after germinating, give rise to conidia of *Hormodendron* which serve to continue the disease caused by *Hormodendron* during the summer.

A list of the species which are regarded as synonymous with *Cladosporium herbarum* is appended.

Cladosporium epiphyllum, Nees. Das Syst. der Pilze und Schwämme.
Cladosporium nigricans, Fr. Syst. Myc., iii, 370.
Cladosporium solutum, Link. Spec., i, 39.
Acladium herbarum, Link. Obs., i, 10.
Byssus caespitosa, Roth. Fl. Germ., iv, 566.
Byssus herbarum, DC. Fl. Fr., vi, 11.
Byssus nigricans, Roth. Catal., i, 126.

Dematium articulatum, Sow. Fung., T. 400, F. 8.
Dematium Brassicae, Pers. Syn. Fung., 699.
Dematium conicum, Schum. Fl. Saell., ii, 445, Nr. 2171.
Dematium epiphyllum, Pers. Syn. Fung., 695.
Dematium fungorum, Pers. Ibid., 699.
Dematium graminum, Pers. Myc. Eur., i, 16.
Dematium herbarum, Pers. Dispos. Fung., 75; Alb. et Schw. Consp. 1104.
Dematium Hippocastani, Pers. Syn. Fung., 698.
Dematium vulgare, Pers. Sec. Steud.

My thanks are due to Lieut.-Col. Prain, C.I.E., F.R.S., Director, Royal Botanic Gardens, Kew, for kindly permitting the work in connexion with this article to be carried out in the Jodrell Laboratory, and also to Mr. G. Massee, F.L.S., for his kind assistance.

Authors quoted.

Cavara: Note sur le parasitisme de quelques champignons. Revue Mycologique, 1891.
Constantin: Recherches sur le *Cladosporium herbarum*. Journ. de Botan., Jan., 1889.
De Bary: Fungi, Mycetozoa, and Bacteria, p. 271.
Janczewski: Polymorphisme du *Cladosporium herbarum*. Bull. de l'Acad. des Sc. de Cracovie, Dec., 1892.
————: Les Périthèces du *Cladosporium herbarum*. Comptes-rendus de l'Acad. des Sc., 1893.
Laurent: Annales de l'Instit. Pasteur, Dec. 1888.
Link: Myc. Obs., ii, p. 37.
Lopriore: Die Schwärze des Getreides, eine im letzten Sommer sehr verbreitete Getreidekrankheit. Berichte d. Deutsch. Botan. Gesellsch., 1892.
Massee: Text-Book of Plant Diseases, 1907.
Prilleux: Maladies des plantes agricoles, 1895.
Prilleux and Delacroix: Note sur le parasitisme du *Botrytis cinerea* et du *Cladosporium herbarum*. Bull. de la Soc. Myc. de France, vii.
Saccardo: Sylloge Fungorum IV.
Sorauer: Handbuch der Pflanzenkrankh., 1886.
Tubeuf and Smith: Diseases of Plants, 1897.

DESCRIPTION OF PLATE XXIV.

Illustrating Mr. Bancroft's Paper on *Cladosporium herbarum*.

Fig. 1. A tuft of hyphae of *Cladosporium herbarum* springing from a mass of cells and bearing conidia.

Fig. 2. A diseased leaf of *Catalpa bignonioides*, showing the effects of the disease caused by the form *Hormodendron*.

Fig 3 a. A conidium of *Cladosporium* which has germinated, and is producing conidia of *Hormodendron*.

Fig. 3 b. Another conidium of *Cladosporium* giving rise to *Hormodendron* after germination.

Fig. 4. Production of conidia of *Hormodendron* from a conidiophore of *Cladosporium* in a 'hanging-drop'.

Fig. 5. Early stages in the germination of conidia of *Hormodendron*.

Fig. 6. Hyphae of the mycelium of *Hormodendron* producing conidia in a culture in nutrient gelatine.

Fig. 7. Later production of conidia of *Cladosporium* from the same mycelium as in Fig. 6.

Fig. 8. Germination of a conidium of *Cladosporium* in a culture in nutrient gelatine with formation of conidia of *Cladosporium*.

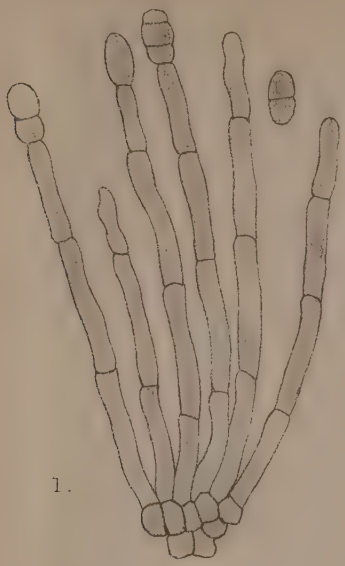
Fig. 9 a. Production of conidia of *Cladosporium* by a conidium of the same form which has germinated at a low temperature.

Fig. 9 b. The same as in Fig. 9 a.

Fig. 10. Germination of a microsclerotium.

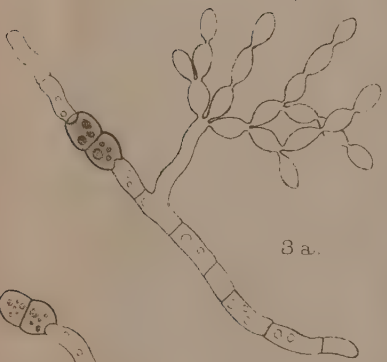
Fig. 11. A conidium produced by a microsclerotium giving rise to conidia of *Hormodendron* after germination.

Fig. 2 natural size; Fig. 10 magnified × 400; the others magnified × 600 (about).

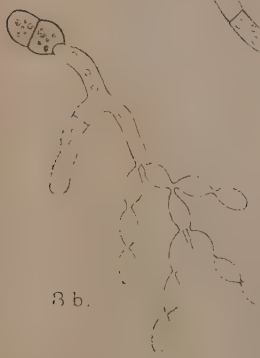


1.

2.



3 a.

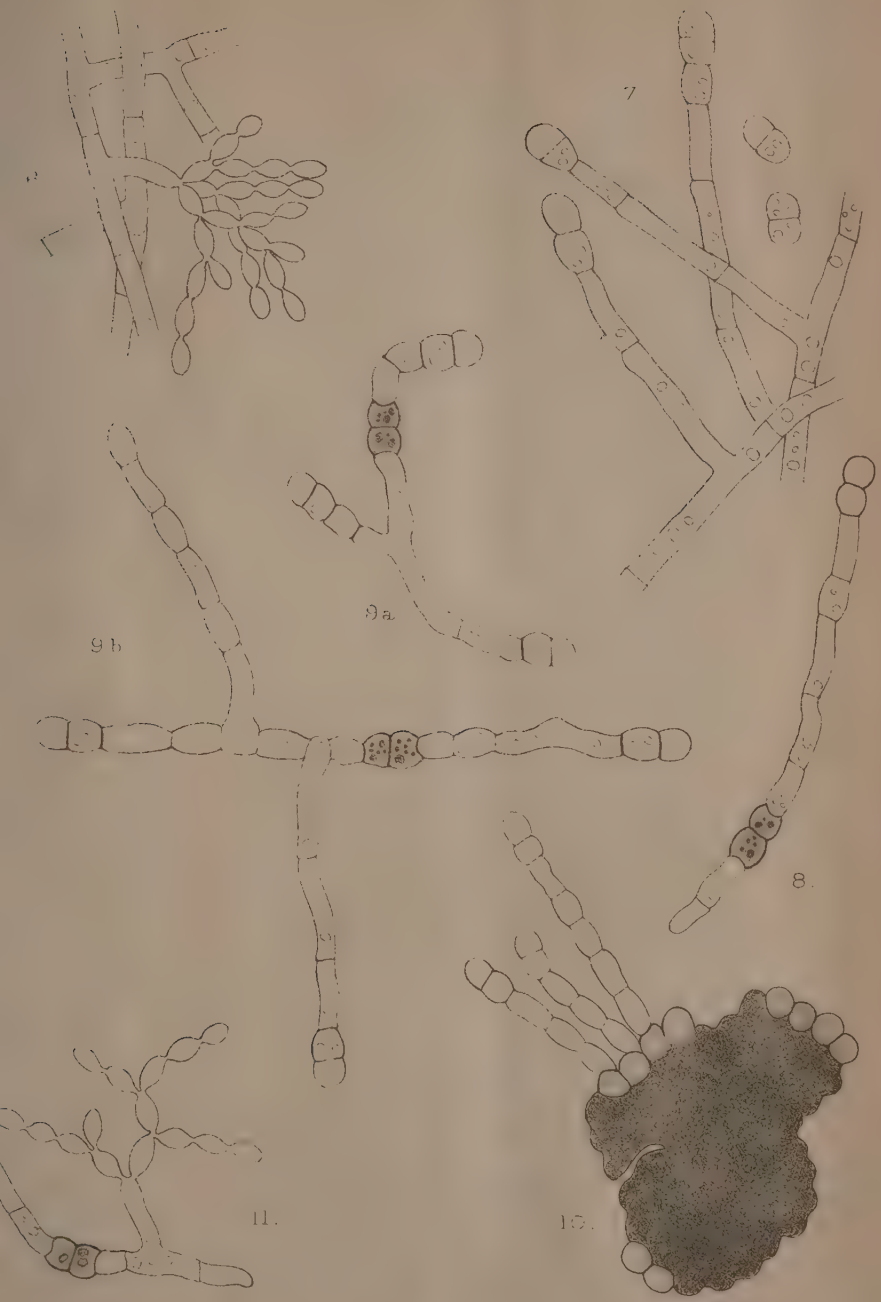


3 b.

5.

4.

BANCROFT — CLADOSPORIUM.



Huth, lith. et imp.

NOTES ON *POLYPORUS SQUAMOSUS*, HUDS.

By F. T. Brooks, M.A.

(Demonstrator of Botany, University of Cambridge).

[Text-Fig. 44.]

[*Re-printed from* The New Phytologist, *Vol. VIII., Nos. 9 & 10, November and December, 1909.*]

THE following notes were made last summer in regard to some sporophores of *Polyporus squamosus* which developed under conditions particularly favourable for observation. In regard to the liberation of spores, these remarks are confirmatory of Buller's extensive work[1] (reviewed in the present issue) on this portion of the general biology of certain groups of the Hymenomycetes.

A cylindrical block of *Acer Negundo* about a foot in diameter had been brought into a room during the early part of May for the use of the Department of Forestry at Cambridge. On May 18th two groups of fungus fructifications which evidently belonged to *Polyporus squamosus* were seen to be arising from the bark. When enquiries were made at the Botanic Gardens whence the block had come I learnt that the specimen had been cut from a tree which had been attacked *in situ* by this fungus. One group of fructifications consisted of a bulbous base from which three stalked sporophores of different sizes arose, the other comprised a similarly swollen base and a single rudimentary pileus. During the three weeks that the fructifications were kept under observation the

[1] Buller, A. H. R. "Researches on Fungi," Longman & Co., 1909.

block of wood remained in a constant position in a dimly lighted room; the larger group of sporophores faced the window, while the smaller one was on the opposite and darker side of the block. Throughout the course of the observations the single sporophore which was on the side of the wood remote from the light remained in a rudimentary condition. This is to be accounted for presumably by the diversion of the stream of nutritive material derived by the sterile mycelium in the wood, to the other group of sporophores which were further advanced in development. It is not likely that diminished light on that side caused a cessation of further growth, because Buller has shewn[1] that as long as feeble light is allowed to impinge upon the sporophore for a short time when young, the fructification will then develop normally although kept in complete darkness.

The dimensions of two of the sporophores of the larger group of fructifications were taken daily by measuring the two longest axes of each at right angles to one another. The third sporophore of this group grew for a short time and then its development ceased, doubtless on account of the available food material being used by the larger pilei. The temperature of the room in which the observations were made varied between 7·8°C and 17·3°C. The following table indicates the amount of linear growth which occurred in the two pilei—called A and B, during the period of observation. On May 23rd and 24th respectively the pilei ceased to increase in area.

Pileus A.

	Length of Axis I.		Length of Axis II.
May 10th	5·8 cm.	...	8·1 cm.
May 23rd	18·3 cm.	...	27·5 cm.
Growth during 13 days ...	12·5 cm.	...	19·4 cm.

Pileus B.

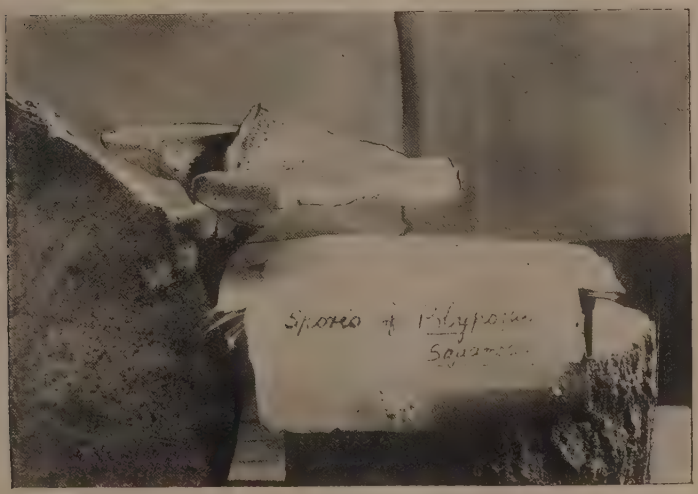
	Length of Axis I.		Length of Axis II.
May 10th	3·6 cm.	...	4·7 cm.
May 24th	13·1 cm.	...	18·7 cm.
Growth during 14 days ...	9·5 cm.	...	14·0 cm.

These figures indicate the rapidity with which the fructification of this fungus grows. The daily measurements are being examined, and it is hoped that they will throw some light on the manner in which growth takes place in the sporophore of *Polyporus squamosus*.

[1] Buller, A. H. R. Loc. cit., p. 59.

It may be pointed out here that an appreciable falling off in growth was observed during the daytime.

On May 23rd, *i.e.*, about the time when growth ceased, spores began to collect upon a piece of black paper placed below the fructifications. No deposition of spores in quantity occurred before this date, On closer examination, the spore cloud already described by Buller[1] as being discharged from *Polyporus squamosus* could be seen distinctly. This faint cloud may be compared with the smoke arising from a smouldering tobacco pipe. The discharge of spores in this manner continued without interruption for a period of ten days. Buller mentions one case in which the spore cloud was emitted for sixteen days. The floor in the vicinity of the block of wood became white with spores. An idea of the enormous quantity of spores produced can be gathered from the accompanying photograph (Text-fig. 44).



Text-fig. 44. "Spore-cloud" of *Polyporus squamosus*. Below the sporophore was placed a piece of black paper, which, together with the surrounding objects, became covered with a thick layer of spores. The paper was so thickly coated that it was possible to write an inscription in the spore covering.

Another interesting phenomenon exhibited by these fructifications was the production of drops of liquid on the under surface. It was noted that these drops formed only towards the end of the period of growth in area of the pileus and after such growth had ceased. This exudation of water is presumably analagous to that

[1] Buller, A. H. R. Loc. cit., p. 89.

which takes place through the hydathodes of the higher plants. The sporophores of other Polyporeæ often liberate drops of fluid from their hymenial surface and in the case of *Polyporus hispidus* considerable quantities of liquid are known to drip away in this manner. The exudation of water from the hyphæ of other fungi is of common occurrence. One may recall the case of *Pilobolus crystallinus*, on the sporangiophores of which drops of liquid are frequently seen.

Série A, n° 280

N° d'ordre : 946

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR M. J. RAY,

Agrégé-Préparateur à l'École Normale supérieure.

1re THÈSE. — Variations des Champignons inférieurs sous l'influence du milieu.

2me THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 24 Juin 1897, devant la Commission d'Examen.

MM. G. BONNIER . . . . . *Président*

MUNIER-CHALMAS. . . . . } *Examinateurs*

A. GIARD . . . . . }

LILLE

LE BIGOT FRÈRES, IMPRIMEURS-ÉDITEURS

68, rue Nationale, et 25, rue Nicolas-Leblanc.

1897

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

	MM.	
Doyen	DARBOUX, professeur	Géométrie supérieure.
Professeurs	DE LACAZE-DUTHIERS	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	HERMITE	Algèbre supérieure.
	TROOST	Chimie.
	FRIEDEL	Chimie organique.
	LIPPMANN	Physique.
	HAUTEFEUILLE	Minéralogie
	BOUTY	Physique.
	APPELL	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ	Calcul des probabilités, Physique mathématique.
	PICARD	Calcul différentiel et calcul intégral.
	POINCARÉ	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	YVES DELAGE	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	DITTE	Chimie.
	MUNIER-CHALMAS	Géologie.
	GIARD	Zoologie, Évolution des êtres organisés.
	WOLF	Astronomie physique.
	KŒNIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
Professeurs adjoints	CHATIN	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	JOLY	Chimie.
	PELLAT	Physique.
	PAINLEVÉ	Calcul différentiel et calcul intégral.
Secrétaire	FOUSSEREAU.	

A Monsieur J. COSTANTIN,

Maître de Conférences à l'École Normale Supérieure,

ET

Monsieur G. BONNIER,

Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne.

A Monsieur F. HOUSSAY,

Maître de Conférences à l'École Normale Supérieure,

ET

Monsieur A. GIARD,

Professeur à la Sorbonne.

A MA MÈRE

VARIATIONS DES CHAMPIGNONS INFÉRIEURS

SOUS L'INFLUENCE DU MILIEU

par M. J. RAY.

INTRODUCTION

Tous ceux qui ont étudié les Champignons ont remarqué le polymorphisme de ces plantes. Quand, par exemple, on examine une moisissure développée sur une substance quelconque, il est rare que, prenant deux fragments en des points même très voisins, on ne trouve pas de différences entre eux ; et une variation, extrêmement petite, survenue dans les conditions du milieu suffit quelquefois à produire des changements très sensibles dans la plante. Nous savons d'autre part que l'on trouve des formes de Champignons très diverses ; chaque jour nous en apporte de nouvelles. Sont-elles très distinctes, irréductibles les unes aux autres, ou bien se métamorphosent-elles sans cesse l'une en l'autre? Jusqu'où peut s'étendre la variation de ces êtres quand les germes s'en disséminent et retombent sur des substrata divers ? Quel est, en d'autres termes, le degré de fixité des formes que nous rencontrons ? D'autre part, quoi qu'il en soit de leur variabilité, comment en établir une classification, une classification naturelle bien entendu ? En quelle mesure faut-il tenir compte d'une ressemblance ou d'une différence ? Il n'est pas évident qu'il faille plutôt réunir deux plantes ayant le même thalle que deux plantes ayant le même appareil reproducteur. Ce sont ces deux questions, *variabilité des caractères* et *importance relative de ces caractères,* auxquelles nous nous sommes proposé de répondre dans quelques cas particuliers.

Nous avons, à cet effet, recueilli des moisissures, et nous les avons cultivées dans des conditions aussi variées que possible.

Que cette méthode nous renseigne sur la variabilité des caractères, cela ne fait aucun doute. Comment maintenant les résultats obtenus peuvent-ils servir à la classification ?

Les formes vivantes actuelles dérivent d'un certain nombre d'autres formes antérieures, celles-ci des précédentes, etc...., l'origine première étant composée de formes très simples. Soit A l'une de ces formes ; elle a produit, en évoluant dans diverses directions, des formes A_1, A_2,....., et d'ailleurs elle a pu se conserver elle-même en se compliquant plus ou moins, donnant un être (A) ; A_1, A_2,..... se comportent d'une façon analogue. La série (A), (A_1)..... représente l'ensemble des formes actuelles. Il existe entre celles-ci des rapports de « parenté » qu'on exprime d'une manière abrégée en disant par exemple que l'une descend de l'autre. Or, on les trouve mêlées d'une façon quelconque. Faire une classification naturelle consiste à retrouver leurs rapports de parenté, et à les grouper ensemble selon ces rapports.

Comment peut-on juger d'une parenté, lorsqu'on dispose simplement des caractères actuels ? Les caractères présentés par une forme ne sont pas d'une acquisition aussi ancienne les uns que les autres. Connaître l'ordre d'apparition des caractères mettrait sur la voie de la solution du problème. Lorsqu'un caractère s'établit dans une forme, il s'ajoute à d'autres, qui pouvaient exister sans lui, et sa qualité dépend forcément d'un ou plusieurs de ces derniers. Ainsi les caractères plus récents dépendent de plus anciens. La variation de ceux-ci modifie toujours les autres ; les premiers *peuvent* varier sans que les seconds s'en ressentent. On conçoit donc que la variation des caractères *puisse* nous renseigner sur ceux qu'il faudra prendre en premier lieu pour établir un groupement, c'est-à-dire sur les plus importants.

Nous avons cherché de plus à mettre en lumière *l'influence exercée par un milieu déterminé*.

Telles étant les considérations qui nous ont guidé, nous avons fait de nombreuses cultures dont les résultats sont exposés dans ce travail. Une moisissure, dans chacun des milieux où nous la plaçons, y acquiert un ensemble de caractères, qui est la mesure de la variabilité de la plante relativement au milieu imposé. Mais ce n'est pas dès le premier développement de la moisissure dans ce milieu que ces caractères sont établis ; on observe d'abord une période

intéressante d'évolution, plus ou moins longue, pendant laquelle la plante *s'adapte*. Nous constatons alors que les *propriétés ainsi acquises se maintiennent* ; elles se transmettent aux générations suivantes, à condition que le milieu soit toujours le même.

C'est par l'étude de ces formes diverses réalisées en partant d'une forme origine que nous commencerons. Nous décrirons d'abord, prenant une de nos moisissures comme type, les cultures pratiquées suivant la méthode ordinaire des laboratoires avec des aliments de toute sorte ; un second chapitre sera réservé à quelques conditions spéciales ; puis, nous parlerons de ces phénomènes qui précèdent l'établissement des caractères correspondant à un milieu déterminé, c'est-à-dire des phénomènes d'adaptation. Après cet exposé, viendra l'examen plus rapide des autres champignons qui avec le premier ont fait l'objet de nos recherches.

Les échantillons d'où nous sommes partis pour procéder aux cultures appartiennent aux genres *Sterigmatocystis*, *Aspergillus*, *Penicillium*. C'est un *Sterigmatocystis* que nous prendrons comme type.

Le nombre de nos cultures a dépassé douze cent. Elles ont été faites sur les milieux suivants :

A. *Milieux solides ou pâteux* :

1° Carotte, pomme de terre, en morceaux ;

2° Riz ;

3° Fragments de canne à sucre ;

4° Gélatine nutritive.

B. *Milieux liquides* :

1° Solutions sucrées : glucose, lévulose, saccharose, au cinquantième ;

2° Jus de carotte ;

3° Empois d'amidon (assez pâteux) ;

4° Solutions de sels minéraux : azotates de potasse et d'ammoniaque, phosphates de potasse et d'ammoniaque au vingt-cinquième.

Ces substances étaient renfermées dans des tubes à essais ordinaires bouchés avec de l'ouate.

Les conditions spéciales dont nous parlions plus haut sont :

1° Milieux liquides *agités* pendant toute la durée du développement de la plante ;

2° Tubes ordinaires fermés hermétiquement ;

3° Tubes de grande dimension, ouverts ou fermés.

Nous avons examiné les cultures à tous les points de vue, dans leur morphologie et leur structure. De même qu'en étudiant les plantes phanérogames, il faut attacher autant d'attention aux racines, tiges et feuilles qu'à la fleur pour connaître complètement un type, de même ici, aucun organe du végétal n'a été négligé dans l'observation soit directe, soit microscopique.

La technique employée par nous est une de celles qui déforment le moins ces plantes délicates ; ceci a grande importance, il eût été fâcheux que des variations fussent introduites par les réactifs.

Notre méthode est simplement la suivante :

1° Fixation par l'alcool à 90° ;

2° Coloration par le violet de Gentiane.

Un fragment de la culture, fixé par un séjour de vingt-quatre heures au moins dans l'alcool, reste ensuite une demi-heure environ dans une solution de violet additionnée de quelques gouttes d'alcool à 90°. La teinture se prépare dans un verre de montre ; elle doit être très-étendue, il faut qu'on puisse apercevoir un objet placé sous le verre.

Ce traitement suffit pour étudier la forme extérieure et le cloisonnement ; le contenu des compartiments se trouve coloré en masse.

Pour voir les noyaux, nous avons eu recours à la coloration par l'hématoxyline ; c'est la teinture préconisée par G. von Istvánffi (1) pour la coloration des noyaux de divers champignons, par M. Léger (2) pour les noyaux des mucorinées.

Nous adressons tous nos remerciements à MM. J. Costantin et A. Giard ainsi qu'à M. Em. Boulanger pour les nombreux matériaux qu'ils ont bien voulu nous donner ; à M. F. Houssay, qui a mis à notre disposition l'avantageuse installation de son laboratoire pour nos expériences sur des liquides agités ; à M. A. Cligny pour son aide précieuse dans le montage de nos appareils.

(1) Berichte d. D. Bot. Ges., 1895.

(2) Léger : *Recherches sur la structure des Mucocinées*, Thèse, 1895.

Chapitre Premier

CULTURE D'UN *STERIGMATOCYSTIS* EN TUBES ORDINAIRES

Ayant laissé moisir des substances alimentaires dans le but de nous procurer des matériaux, nous avons trouvé à la surface d'un fromage une efflorescence blanche ; c'est un champignon dont la diagnose se rapproche le plus de celle donnée par Saccardo pour le *Sterigmatocystis alba* :

S. alba Van Tieghem — Mycelio maculiformi albo ; hyphis filiformibus 84 μ longis, vesiculam 35-45 μ diam. gerentibus ; basidiis 16-17 μ longis ; sterigmatibus 12-13 μ longis ; conidiis sphæricis albis 3,2 p diam.

Nous allons entreprendre la description précise des cultures qui en ont été faites sur les milieux cités plus haut.

1° Cultures sur liquides sucrés

a) *Glucose* (Pl. 14, fig. 14).

A la surface du liquide s'étend un feutrage très léger, peu opaque, blanchâtre ; par endroits se dressent dans l'air de petits amas blancs d'aspect granuleux. C'est l'appareil végétatif ou thalle du champignon qui forme la première partie de cet ensemble ; le reste est la fructification. Le port de la plante est différent de celui qu'elle présentait sur le milieu d'origine : l'appareil végétatif y était diffus au point de n'être presque pas visible, et la fructication avait une forme plus précise.

Le feutrage qui constitue le thalle est un enchevêtrement très complexe de filaments incolores, très ramifiés sans régularité aucune, étroits et d'un calibre à peu près constant. Nous en indiquerons les dimensions dans un tableau final. Tous sont divisés

par des cloisons planes, en général équidistantes ; dans le cas où la largeur est un peu plus considérable, les cloisons sont un peu plus rapprochées ; quand elle est un peu moindre, les cloisons s'éloignent : il semble donc que l'espace compris entre deux cloisons soit constant (ce n'est pas spécial au cas actuel ; les filaments des oscillaires, par exemple, présentent la même disposition). Les compartiments en lesquels sont ainsi partagées les hyphes du champignon renferment chacun plusieurs noyaux ; ce sont des articles; les noyaux sont petits et n'ont pas une grosseur invariable (Pl. 12, fig. 5a et 5b). La structure articulaire n'a pas encore été signalée dans le genre *Sterigmatocystis*, mais dans un genre très voisin, le genre *Aspergillus* (*A. glaucus*) elle a été mise en évidence par M. Dangeard (1).

La fructification (fig. 14) est un groupe de filaments dressés terminés par un massif de spores. Le pied qui porte cette masse est identique, à part sa forme droite, aux filaments du thalle. L'extrémité libre est arrondie et porte trois ou quatre filaments semblables très courts et par conséquent peu ou point cloisonnés, insérés à la même hauteur. En certains endroits de la préparation, on ne voit pas autre chose. Ailleurs, chacun de ces filaments terminaux est plus long et fragmenté en de très courts articles légèrement renflés dans leur région moyenne ; leur largeur augmente progressivement au fur et à mesure qu'on se rapproche du sommet d'un filament. En d'autres endroits, les articles terminaux, c'est-à-dire les plus gros, qui sont en même temps presque ronds, sont séparés les uns des autres, la membrane commune s'étant gélifiée dans sa région moyenne. La gelée finit par se dissoudre et l'on trouve des articles isolés. Ce sont des spores, car ils peuvent se développer en filaments mycéliens identiques à ceux de la plante mère. Leur formation, dans son origine et dans la différenciation, est successive, mais toutes, une fois détachées, ont les mêmes dimensions. Le nombre n'en est pas le même sur les trois branches du même pied ni sur deux pieds différents. Enfin, la partie du filament sporifère qui demeure stérile et sert de pédicelle au chapelet de spores n'a pas une longueur constante.

Les caractères de la reproduction en culture sur glucose sont donc :

(1) Dangeard : *La reproduction sexuelle des Ascomycètes* (le Botaniste, série IV).

1° Ramification verticillée d'un filament dressé ;

2° Formation, sur chaque rameau, d'un chapelet de spores qui toutes ont même diamètre.

En quoi s'est modifiée, dans le changement de milieu, la plante déterminée *Sterigmatocystis alba* ? Un certain nombre de caractères se sont conservés : la structure articulaire du thalle, la ramification terminale dans le cas de reproduction, le chapelet de spores, et enfin *la dimension des spores*. Tous les autres se sont plus ou moins effacés ou même ont disparu ; d'une façon générale, ce sont les qualités de nombre qui ont varié surtout.

b) *Lévulose.*

La culture sur lévulose est identique à celle sur glucose.

c) *Saccharose* (Pl. 14, fig. 17).

Le Champignon s'est fort peu développé ; on ne voit que quelques flocons d'un tissu très léger.

Il y a encore un enchevêtrement, très ramifié, de filaments cloisonnés en articles, mais ceux-ci ont un contour irrégulier et un volume variable. On trouve soit de courts articles renflés, soit de plus longs articles dont la surface présente des renflements locaux. Parmi les premiers, il en est qui n'ont plus entre eux qu'un contact de faible étendue ; ils ont presque la forme sphérique. Les dimensions de tous les articles sont supérieures à celles de la précédente culture.

L'appareil reproducteur est plus différencié et rappelle davantage le type origine ; c'est toujours cependant un filament dressé portant un amas de spores, un pied et une tête sporifère. Le pied n'a pas la même constitution qu'un segment du thalle, c'est un filament non cloisonné, long et rectiligne, relativement étroit, terminé par un renflement. Sur ce renflement sont insérés, en nombre variable, de courts articles, dont la hauteur et la largeur sont généralement variables ; chacun d'eux se ramifie en deux ou trois branches courtes prolongées par un chapelet de spores. Ces dernières branches sont semblables à celles qui portaient des spores dans la culture sur glucose, mais seulement quand la différenciation en est achevée ; la branche sporifère jeune n'est pas

identique dans les deux cas, elle se distingue principalement ici par le fait que la formation des spores n'apparaît plus si nettement comme une fragmentation successive en articles d'abord presque semblables aux autres ; la sporogenèse est plus condensée, elle se montre comme un bourgeonnement progressif du filament, et le bourgeon a la forme d'une spore petite. En second lieu, nous voyons que les rapports de l'hyphe sporifère avec le pied sont plus compliqués ; l'insertion n'est pas directe, il y a ce qu'on peut appeler des basides (sans vouloir chercher ici une homologation avec les basides des champignons supérieurs). C'est donc toute la complication du *Sterigmatocystis alba*, mais sans différenciation poussée aussi loin, puisque les divers organes ne présentent ni forme ni dimension constantes.

Les caractères suivants se sont par conséquent maintenus : ramification terminale en hyphes sporifères, chapelets de spores, basides, dimension des spores.

En somme, dans les liquides sucrés employés ici, le *Sterigmatocystis alba* a donné :

Un thalle feutré peu consistant, très fragmenté, souvent avec dissociation concomitante.

Un appareil reproducteur formé d'un filament dressé, non différencié, ramifié au sommet en filaments courts que terminent des chapelets de spores de dimension constante ; cette ramification terminale peut se faire à deux degrés.

2° Culture sur l'empois d'amidon

L'empois dont nous nous sommes servis était d'une consistance pâteuse.

On voit se dresser de place en place, parfois réunies en groupe assez serré, des têtes fructifères. L'appareil végétatif n'est pas visible. Il est formé en effet d'un mycélium très diffus ; si l'on examine au microscope un peu de la matière amylacée superficielle, on y trouve un lacis fort lâche d'hyphes ramifiées et abondamment cloisonnées (Pl. 14, fig. 18). Les articles sont de deux sortes, les uns allongés et cylindriques, cependant légèrement renflés à leurs bouts, les autres courts et arrondis ; la première forme se trouve de préférence au voisinage de la surface, la seconde

est dans la profondeur. Cette irrégularité nous rappelle ce que nous avons vu dans la culture sur saccharose, mais elle est moins accentuée. Les pieds sporifères sont des filaments larges, longs, coupés par d'assez fréquentes cloisons, munis d'un renflement terminal ; c'est maintenant une complication plus grande que le type origine. Par contre, *à part les spores*, le reste de la fructification n'a pas une forme déterminée ; on y retrouve pourtant à l'état de tendances les caractères manifestés par la précédente culture.

Envisageons maintenant les cultures faites sur des milieux plus complexes, carotte, pomme de terre, soit solides, liquides. Il y a ici mélange d'aliment sucré et d'aliment amylacé ; le premier prédomine dans la carotte, le second dans la pomme de terre.

3° Culture sur carotte solide

(Pl. 13)

Le développement de la moisissure est ici d'une grande intensité. Tandis que dans les milieux précédents, le saccharose par exemple, il faut un ou deux mois pour obtenir un léger flocon de mycélium, il suffit ici de cinq jours pour que le morceau de carotte soit presque entièrement blanchi d'une fructification très compacte, semblable en son aspect extérieur à celle qui recouvrait le fromage où nous avons trouvé le Champignon. La carotte solide est un milieu extrêmement nutritif et qui convient parfaitement à la plante. Il est même loin d'être épuisé par une première production ; si l'on gratte la surface de la carotte recouverte par le Champignon de manière à enlever au moins toute la fructification de celui-ci, au bout de quatre à cinq jours, la culture a repris son premier aspect ; cela prouve de plus que le mycélium n'a pas excrété dans le substratum de substance soluble nuisible ; les spores tombées de n'importe quelle fructification ont pu germer comme celles qu'on avait semées, et se développer de la même façon. Nous ajouterons à ce propos que le phénomène de la germination sur place des spores avec reprise de végétation se manifeste toujours, mais au bout d'un temps plus long, dans n'importe quelle culture, et il est bon d'examiner les cultures dans la première phase.

Si l'on fait une coupe dans le morceau de carotte envahi par le

Champignon, on constate à l'œil nu que sa surface porte, intimement appliquée contre elle, une peau blanche d'un demi-milimètre d'épaisseur : on peut l'enlever sans arracher en même temps des parcelles du milieu nutritif ; elle porte à sa face supérieure les têtes fructifères.

Examinons au microscope une coupe très mince. Dans la portion de cette coupe qui intéresse la carotte, au milieu d'une pulpe remplie de chromoleucites et de cristaux d'oxalate de chaux, on voit serpenter en tous sens des filaments mycéliens. Les parois des cellules de la carotte sont encore distinctes, plus ou moins déchirées, mais les vaisseaux du bois sont fort bien conservés. Quand on se rapproche de la surface, le mycélium est très enchevêtré ; à la surface même, on aperçoit un tissu très serré, un stroma, la peau blanche de tout à l'heure, dont la région libre est pourtant un feutrage peu compact. Telle est la répartition du thalle. La forme et la structure des filaments n'est pas la même suivant qu'on envisage le mycélium interne ou le stroma, et dans celui-ci la région moyenne ou les bords.

1. *Mycélium interne* (Pl. 13, fig. 6a). On est immédiatement frappé du contour très sinueux en même temps que de la ramification fréquente des filaments qui présentent de nombreuses expansions latérales arrondies. On observe en outre de fréquentes anastomoses entre ces filaments. Leur largeur est relativement grande, nous n'avions pas de filaments d'un aussi grand diamètre dans les cultures antérieures. Les cloisons sont rares, les articles par conséquent très longs et contournés. C'est presque une *tendance à la structure continue*. Nous ne saurions mieux faire comprendre la nature de ce mycélium qu'en le comparant au thalle intercellulaire de champignons parasites, en particulier à celui d'une Péronosporacée. Du reste, il n'y a pas grande différence entre les conditions de vie du parasite qui serpente dans les lacunes de la feuille plus ou moins remplies des produits de gélification des membranes et de la moisissure qui se développe dans la masse des cellules disjointes de la carotte. Un autre caractère assez remarquable de ce mycélium est la formation, principalement au voisinage des vaisseaux du bois, de filaments spéciaux, en tous points comparables aux poils absorbants des racines terrestres ; ils présentent

une surface accidentée dont la forme est évidemment ici déterminée par les obstacles rencontrés (parois des vaisseaux). Cela montre bien la souplesse de ce mycélium interne.

2. *Stroma* (Pl. 13, fig. 6b). — Au voisinage du stroma, le mycélium change progressivement de nature. Voici quelle est la constitution de ce stroma : des filaments très entortillés les uns dans les autres, ramifiés, sans sinuosités cette fois, mais au contraire avec des changements de direction brusques ; leur largeur est moindre, avec une membrane plus épaisse ; les cloisons sont rapprochées. Ce tissu très dense est essentiellement superficiel. A sa face libre, les filaments sont formés d'assez longs articles, droits, renflés à un bout, présentant une membrane assez épaisse. J'insiste sur ce renflement d'une extrémité, qui a cette particularité de ne jamais se manifester sur deux extrémités d'articles en contact; il est toujours sur le bout le plus jeune, c'est-à-dire contre la cloison la dernière formée ; il résulte d'une continuation de la croissance après l'apparition de cette cloison. Ce caractère s'est d'ailleurs manifesté dans le mycélium aérien de bien des cultures du Champignon qui nous occupe.

Nous avons donc un thalle très développé comprenant :

1° Un mycélium sinueux, souple, large, presque continu ;

2° Un stroma résistant, avec hyphes superficielles en articles cylindro-coniques.

Le pied fructifère est un filament dressé, long et large, à membrane deux ou trois fois plus épaisse que celle des filaments aériens ordinaires (Pl. 13, fig. 6d). Sur toute sa longueur, il est sectionné par des cloisons planes perpendiculaires à son axe, formées d'une membrane assez mince ; on peut compter une trentaine de pareilles cloisons sur une longueur de un millimètre. Le sommet est renflé et porte en grand nombre des articles (basides) dont la longueur est à peu près égale au diamètre de la tête et la largeur moyenne trois fois moindre ; ces basides ne sont pas cylindriques, mais plus larges à l'extrémité libre ; chacune est divisée en son milieu par une mince cloison. Elles sont couronnées d'une touffe de quatre ou cinq petits articles (stérigmates) tous de même dimension et portant des chapelets de spores. Le diamètre des spores n'a pas varié.

Par conséquent la plante présente ici un appareil reproducteur caractérisé essentiellement par :

1° Un pied différencié avec cloisons ;

2° Une tête couverte de grosses basides cloisonnées ;

3° Une ramification terminale de ces dernières en stérigmates prolongés par des chapelets de spores.

Les parties de même nom ont toutes des dimensions constantes, qui seront indiquées plus loin.

4° Culture sur pomme de terre solide (Pl. 12).

Aussi abondantes que les précédentes, se manifestant avec les mêmes caractères à l'examen macroscopique, les cultures sur pomme de terre solide montrent cependant de sensibles différences à l'observation microscopique. Le thalle est encore à étudier à l'état de mycélium et à l'état de stroma.

Lorsqu'on fait une préparation en écrasant un peu de pulpe de la pomme de terre prise au voisinage de la surface, les cellules, qui sont restées dans la stérilisation parfaitement entières, se séparent simplement les unes des autres demeurant toujours intactes, et l'on peut voir leurs intervalles parcourus dans tous les sens par du mycélium en réseau fort peu serré ; les cellules elles-mêmes sont recouvertes d'un lacis intimement appliqué à leur surface et formé de filaments qui serpentent en courbes sinueuses (Pl. 12, fig. 2). La position de ceux-ci est à préciser ; ils sont tantôt en dehors de la membrane, tantôt en dedans, mais toujours contre ; enfin, souvent on peut les suivre sur un assez long trajet dans l'épaisseur même de la membrane, qui est fortement gonflée. Jamais on ne les voit traversant une cellule. La forme et la structure de ce mycélium est la même, un peu plus différenciée dans le même sens cependant, que celle du mycélium observé dans la carotte. Ici, mieux encore, les contours arrondis, les expansions latérales, les cloisons rares, rendent la ressemblance frappante avec le thalle des parasites ; la comparaison est même plus nette, à cause de l'intégrité des cellules du substratum. Nous n'avons pas observé de poils mycéliens ; il n'y avait d'ailleurs point de vaisseaux dans la région examinée.

Le stroma est plus développé et plus dense que précédemment; à ce dernier point du vue, le mycélium aérien, c'est-à-dire le tissu lâche de la surface, offre une particularité : très fréquemment les filaments sont accolés, par dix environ, sur une assez grande longueur, formant ainsi d'épais cordons ; ils présentent d'ailleurs alors une membrane plus mince, des cloisons moins fréquentes et un calibre plus régulier.

La fructification est formée d'un pied différencié sans cloisons (Pl. 12, fig. 1), d'une tête avec basides et stérigmates, de chapelets de spores. Le pied et la tête ont les mêmes dimensions, à peu de chose près, que dans la culture sur carotte, mais les basides sont trois fois plus courtes et moins larges, elles ne sont pas cloisonnées. Les spores ont le diamètre invariable.

Ce qui est spécial à ces cultures sur pomme de terre, c'est pour le thalle : fasciation du mycélium, stroma plus compact ; pour l'appareil reproducteur : basides et stérigmates de petite dimension, absence de cloisons.

5° Culture sur jus de carotte

Sur le jus de carotte, se développent rapidement des paquets de mycélium portant bientôt du stroma couvert de fructifications.

Le mycélium entièrement plongé dans le liquide ressemble à celui que nous avons décrit plus haut pour les parties profondes des cultures sur amidon par exemple.

Le mycélium superficiel est moins ramifié, à filaments plus droits, constitués par d'assez longs articles.

Bien qu'on puisse s'attendre à une identité presque complète entre les deux fructifications sur jus de carotte et carotte solide, on constate des différences dans la qualité et dans les dimensions des diverses parties : ainsi, les pieds manquent de cloisons, les basides aussi ; ces dernières sont plus petites. Il n'y a que les spores de toujours immuables.

6° Culture sur gélatine nutritive.

Nous considérons maintenant un nouveau genre de milieu, aussi complexe, mais très riche en albuminoïdes. C'est un mélange de jus de bœuf, de peptone, et de gélatine.

La moisissure liquéfie la gélatine, formant à sa surface une croûte mince avec têtes sporifères blanches ; un mycelium (Pl. 15, fig. 22) lâche, peu ramifié, à contours sinueux, cloisons rares, un stroma sans consistance, tels sont les caractères du thalle. Dans les régions superficielles, on trouve particulièrement abondants et développés ici les articles cylindro-coniques.

Les têtes sporifères et leurs pédicelles, aussi compliquées que dans le Stérigmatocystis origine, ont simplement des dimensions moindres, à part les spores. Les basides sont plus courtes que dans le cas précédent, les stérigmates ont la moitié de leur longueur.

Nous venons de voir des variations continuelles d'un milieu à l'autre, mais sans écart bien considérable. La forme primitive s'efface presque entièrement au contraire dans les cultures sur sels minéraux.

7° Cultures sur solutions salines.

a) *Azotates.*

Azotate de potasse (Pl. 15, fig. 20). — Au bout d'un mois environ après le semis, le liquide est rempli de nombreux flocons à surface très déchiquetée. Pas de fructification apparente.

Il y a pourtant lieu de rapporter une partie seulement de la plante ainsi constituée à un thalle et le reste à une fructification.

Le premier forme la plus grande partie de l'ensemble. C'est un stroma, peu consistant, dont les hyphes sont cloisonnées en articles courts et étroits, légèrement renflés aux deux bouts, ne présentant même souvent qu'un contact de faible étendue.

De place en place, dans la préparation, nous trouvons de larges et longs filaments rectilignes, irrégulièrement cloisonnés, détachant parfois un mince rameau au voisinage d'une cloison ; leur membrane n'est pas plus épaisse que celle des filaments du thalle. L'une des extrémité se perd dans le thalle, l'autre est renflée en une tête mamelonnée, mais assez pauvrement ; un certain nombre de mamelons se sont allongés en un grêle filament présentant çà et là des renflements assez accusés ; la tendance au développement en largeur, qui ne s'est pas épuisée dans la formation d'une tête sporogène achevée, se manifeste dans ces filaments. On reconnaît là une ébauche des fructifications ordinaires. Donc, un thalle très cloisonné, avec rudiments de fructifications où nous retrouvons la ramification terminale.

2° *Azotate d'ammoniaque* (Pl. 15, fig. 19). — Moins abondant est le rendement dans ce milieu ; on obtient simplement un certain nombre de petits amas superficiels recouverts par endroits d'une sortes de pulvérulence ténue.

Chaque amas est élastique, résistant au déchirement et à l'écrasement ; la ramification des hyphes est très compliquée, les articles sont de forme irrégulière, d'un volume plus grand que ceux de la culture précédente, à membrane souvent épaissie.

L'appareil fructifère est très différent de ce que nous avons rencontré jusqu'à présent ; et d'abord on trouve à l'extrémité de rameaux quelconques des ensembles de trois ou quatre filaments fragmentés dans toute leur région inférieure en articles courts : cela ressemble un peu à ce que nous avons décrit à propos du glucose, mais il ne se sépare point d'articles terminaux sous forme de spores, la croissance du filament se poursuit même avec le processus habituel ; voilà qui rappelle encore pourtant le pied sporifère des autres cultures, mais il n'y a point de spores. Ce sont néanmoins des spores qui produisent l'aspect de pulvérulence signalé plus haut. Effectivement, certain rameaux, en général voisins les uns des autres, mais sans disposition caractérisée, sont transformés à leur bout en un chapelet de deux ou trois spores, d'autres spores en formation s'indiquent au-dessous, et le diamètre de ces spores est le même que précédemment. Donc, des caractères de l'appareil reproducteur il persiste ici simplement : une ramification terminale assez effacée et les chapelets de spores, enfin le volume de ces dernières.

b) *Phosphates* (Pl. 15, fig. 21).

1° *Phosphate de potasse*. — La culture est très peu développée en comparaison de celle obtenue avec l'azotate de potasse, mais elle présente la même structure à tous les points de vue.

2° *Phosphate d'ammoniaque*. — Ici au contraire le rendement est relativement considérable ; c'est encore la seule différence avec la culture dans l'azotate d'ammoniaque.

Nous avons terminé ainsi l'étude des formes obtenues en semant des spores de *Sterigmatocystis alba* sur diverses substances nutritives dans les conditions ordinaires.

Nous résumons et complétons cette étude par le tableau suivant :

Cultures de Sterigmatocystis alba. — *Tableau des Résultats*

MILIEUX	THALLE		APPAREIL REPRODUCTEUR				
	Mycelium	Stroma	Pied	Tête	Basides	Stérigmates	Spores
1° Glucose.	indistincts		indéterminé	o	o	indéterminés	en chapelet 3 µ,1
1° Lévulose.	articles rectang. courts, larg. 3 µ		id.	id.	id.	id.	id.
1° Saccharose.	id.		filam. long	indéterminée	indéterminées	id.	id.
	indistincts		o cloisons				
	articles renflés courts						
2° Amidon.	indistincts		long. 233 µ	diam. 9 µ	id.	id.	id.
	articles renflés		larg. 8 µ				
			cloisons				
3° Carotte.	art. très longs, sinueux, larg. 4 µ,2, membe mince	art. courts, rectang., membrane épaisse	long. 1125 µ	31 µ	37 µ,5	12 µ,5	id.
			larg. 8 µ,3				
			cloisons				
4° Pomme de terre.	id.	id.	long. 1250 µ	31 µ	12 µ,5	8 µ	id.
			larg. 12 µ,5			(2-3)	
5° Jus de Carotte.	*Superf.* articles rectang. longs / *Profond.* articles sinueux pls longs larg. 3µ,1	id.	long. 1250 µ	36 µ	15 µ	10 µ	id.
			larg. 10 µ			(3-4)	
6° Gélatine.	art. sinueux, longs, larg. 3 µ,3	id. peu serré	long. 600 µ	18 µ	12 µ	6 µ	id.
			larg. 6 µ			(2-3)	
7° Azotate de potasse.	indistincts art. en haltères, courts, étroits (1 µ)		indéterminé	indéterminée	indéterminées	indéterminés	indéterminées
			cloisons				
7° Azotate d'ammoniaque.	indistincts art. irréguliers, plus gros		indéterminé	o	o	o	en chapelet 3 µ,1

Conclusions tirées de cette étude.

A chaque milieu correspond donc une forme différente, et les différences sont du même ordre que celles dont on fait d'habitude les espèces. Le *Sterigmatocystis* étudié présente par conséquent une grande variabilité ; d'autre part, avons-nous dit, les formes nouvelles sont fixes.

Des résultats du même genre avaient déjà été obtenus pour d'autres Champignons et pour des Bactéries.

M. Laurent, dans ses recherches sur *Cladosporium herbarum* (1), s'était trouvé en présence de sept formes diverses, dont un *Penicillium*. M. Hansen (2) a montré la variabilité des levures dans leur forme et leur taille suivant les milieux, mais il n'a pas toujours produit des variétés stables. Wasserzug (3), en cultivant le *Micrococcus prodigiosus* dans un milieu acide, l'a transformé en un Bacille, et cette variation se maintenait, à condition de ne point revenir aux bouillons alcalins. Metchnikoff (4) constate que le *Spirobacillus Cienkowskii* de la Daphnie est susceptible, au cours de l'évolution de la maladie qu'il produit, de prendre cinq formes différentes, Bacilles ou Spirilles.

Bien plus, on a rencontré chez d'autres champignons que le *Sterigmatocystis* des formes analogues à celles qu'il nous a montrées ; le thalle dissocié de la culture sur saccharose nous rappelle les formes levure que M. Brefeld a trouvées chez les Ustilagineés et les Basidiomycètes, M. Duclaux chez l'*Oidium lactis*, MM. J. J. Juhler et Jörgensen, M. Sorel plus tard, chez l'*Aspergillus Oryzæ*.

Nous verrons d'ailleurs dans le second chapitre d'autres variations du *Sterigmatocystis alba*.

Cela étant posé, des faits précédents, nous pouvons tirer des conclusions de deux sortes, les unes relatives aux variations considérées en soi, indépendamment du milieu qui les a produites, les autres relatives à ces mêmes variations en tant que déterminées par tel ou tel milieu.

(1) Annales de l'Institut Pasteur, 1888.
(2) Annals of Botany, 1895.
(3) Annales de l'Institut Pasteur, 1888.
(4) Annales de l'Institut Pasteur, 1889.

1° Thalle.

Relativement aux variations considérées en elles-mêmes, deux caractères seulement se sont maintenus constamment dans la forme et la structure de l'appareil végétatif.

1° Le thalle est constitué par des filaments ;

2° Les filaments sont cloisonnés en articles.

Les *dimensions* de ces articles ont *varié dans chaque cas*, elles ne sont demeurées les mêmes que dans un milieu donné. Comme la plante à l'état libre, c'est-à-dire non cultivée en tubes, ne pousse pas indéfiniment sur le même substratum, il en résulte que dans l'étude d'une pareille moisissure, les caractères tirés des dimensions n'ont de valeur que pour le milieu où elle est rencontrée. Les deux premiers, *filaments*, *articles*, sont *les plus importants* dans tous les cas.

Envisageons maintenant les rapports qui peuvent exister entre les qualités physiques ou chimiques du substratum et la nature de l'appareil végétatif.

Il a été employé soit des milieux liquides, soit des milieux solides, avec tous les intermédiaires entre ces deux états. Les filaments du Champignon qui se développe pénétrent toujours plus ou moins suivant les circonstances à l'intérieur du milieu ; une autre partie de la plante, qui est souvent la plus considérable, demeure au contraire extérieure et se nourrit par l'intermédiaire de la précédente. Ces deux portions du thalle, superficielle ou profonde, sont très différentes l'une de l'autre ; à la surface des liquides ou des solides, les articles ont la forme de cylindres ou ont tout au moins une symétrie axiale ; ce caractère de régularité est surtout manifeste dans un stroma jeune, il s'efface plus ou moins dans un stroma plus développé, en raison même de l'enchevêtrement des hyphes : celles-ci, gênées dans leur croissance, se développent selon l'espace libre qui s'offre à elles. Par contre, dans les profondeurs d'un liquide, les hyphes ont un contour irrégulier, sont renflées en des points quelconques, parfois sur toute leur surface, ce qui forme des articles presque sphériques ; dans l'empois d'amidon, il en est de même ; en outre, le plus souvent, en ces deux cas, le cloisonnement est poussé très loin,

on peut enfin avoir une fragmentation ; dans la pulpe sucrée ou amylacée, nous avons trouvé un thalle qui lui aussi montre un contour très irrégulier, très sinueux, mais le cloisonnement y est rare. Pour interpréter ces faits, il suffit de remarquer que le thalle étant plongé dans le milieu nutritif, il y a, autour de lui, identité relative des diverses conditions : en particulier, ce thalle se nourrit par toute sa surface. Ceci détermine une tendance au *développement égal dans tous les sens* ; cette tendance, qui est contrebalancée par la nature filamenteuse de la plante, se traduit par la production d'hyphes à nombreux renflements, caractère dont nous venons de dire la généralité. L'existence d'un plus grand nombre de cloisons sur une longueur déterminée serait due, jusqu'à un certain point, au fait même de la croissance en largeur s'opposant à la croissance en longueur, d'où peut résulter un raccourcissement des articles ; mais elle a une autre cause évidente, le faible pouvoir nutritif des milieux où on l'observe.

Pourquoi au contraire, dans la pulpe de carotte et de pomme de terre, le thalle, en même temps qu'un contour irrégulier, prend-il une structure presque continue ? C'est que, si le développement égal en tous sens est favorisé, moins pourtant que dans un liquide, le développement en tubes mycéliens est davantage suscité par la forme de l'espace libre offert à la plante, et d'un autre côté, les conditions de vie ne sont pas en rapport avec la formation d'un système de soutien : elles rappellent certaines conditions de parasitisme ; or nous avons signalé, dans un précédent travail, le cas d'un *Trichoderma* devenant parasite de *Mucor crustaceus* et prenant la structure continue (1).

2° Appareil reproducteur.

Quelles que soient les variations introduites dans le milieu, nous retrouvons les caractères suivants :

1° Filament dressé ;

2° Ramification terminale de ce filament ;

3° Chapelet de spores ;

4° Spores de 3 μ, 1, arrondies.

Ceux que nous rencontrons le plus souvent ensuite sont : basides

(1) *Mucor et Trichoderma*, Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, 1896.

et stérigmates, un gros renflement au sommet du filament dressé.

Il y a quelque chose de commun à tous ces caractères, le *développement d'une partie aérienne* de la plante dans *toutes les directions*. Cela est très net si nous laissons de côté les cas où manque le gros renflement terminal, la tête. L'extrémité d'un filament dressé prend ou tend à prendre une forme sphérique : égalité de croissance en tous les points Cette croissance continuant, il se fait des replis de la surface : ce sont d'abord les basides. La raison de ces replis est probablement une raison mécanique, une raison d'équilibre du système, la surface ne pouvant croître indéfiniment en restant sphérique. Les replis ne peuvent croître que par leur côté libre, chacun d'eux ayant néanmoins les mêmes tendances que le renflement primitif : dans les conditions où ils se trouvent, serrés les uns contre les autres, ces tendances s'effacent, et l'on voit reparaître le développement prépondérant dans une direction déterminée. C'est ainsi que les replis secondaires ou stérigmates qui se forment à l'extrémité libre des basides, comme ces dernières au sommet du pied, ressemblent beaucoup à des filaments ordinaires sans être pourtant bien serrés les uns contre les autres. Sur eux naissent les spores : c'est un cloisonnement suivi de fragmentation en petits articles arrondis et là s'arrête le développement du pied : il y a dans ce phénomène — on le voyait tout à l'heure pour le mycélium — une manifestation du même mode de croissance.

Considérons maintenant les cas laissés de côté : du processus que nous décrivions à l'instant, il disparaît tous les stades correspondant à une croissance abondante ; la masse de champignon produite est d'ailleurs beaucoup moins considérable.

Donc partout se présente, si l'on peut s'exprimer ainsi, le *développement sphérique*. C'est le caractère dominant, les autres lui sont subordonnés. Ce caractère qualitatif est accompagné d'un caractère quantitatif important, la *dimension constante des spores* (3 μ, 1).

Le plus souvent ensuite le développement sphérique se traduit par l'existence d'une *tête ronde à replis de deux ordres*.

Enfin, *toutes les dimensions* autre que celles des spores *varient* sans cesse.

Nous classons ainsi par ordre d'importance les caractères de la

moisissure étudiée, nous essayons en même temps de les expliquer dans une certaine mesure. Tout au moins cette classification est-elle faite dans les limites de nos expériences, mais nous avons considéré des conditions suffisamment variées pour attribuer à nos résultats quelque généralité. La suite de notre étude viendra les confirmer.

Chapitre II.

CULTURES DU *STERIGMATOCYSTIS ALBA* DANS QUELQUES CONDITIONS SPÉCIALES.

I.

Cultures dans un liquide en mouvement.

Personne n'ignore le faciès particulier des plantes et animaux vivant sur les côtes, battus par les vagues, sans cesse enveloppés de tourbillons liquides.

Ayant à notre disposition des êtres à développement facile et rapide, nous les avons placés dans un milieu analogue ; nous pensions obtenir ainsi d'intéressantes variations, intéressantes soit en elles-mêmes, soit à l'égard des facteurs physiques mis en jeu.

L'influence du mouvement sur les plantes inférieures a déjà fait l'objet d'un certain nombre de recherches.

En 1878, M. Howarth constatait que des Bactéries placées dans un liquide violemment agité ne se développaient pas. M. J. Reinke reprit cette question (1), mais le mouvement était cette fois produit par le passage d'une onde sonore due aux vibrations longitudinales d'une verge ; il obtint dans ces conditions un développement de la plante, bien plus lent que dans le bouillon au repos.

M. Schmidt, en 1892 (2) étudia des cultures de Bactéries faites en prenant d'une eau contenant ces Bactéries qui avait été agitée soit à la main, soit par un appareil à secousses : dans le premier cas, il avait tué le *Staphylococcus pyogenes citreus*, dans le second cas, il avait exercé une action moins forte sur deux microbes, dont la Bactéridie charbonneuse.

La même année, M. H. L. Russell (3) fit des expériences sur la

(1) Sep. abdr. aus Pflüger's archiv f. d. gesammte Physiologie 1881.
(2) Arch. f. hygiene.
(3) Bot. Gazette 1892.

croissance en liquides agités des *Monilia candida, Oïdium albicans, Saccharomyces, Mycoderma.* Ces Champignons se développent, mais en donnant beaucoup de cellules et peu d'hyphes.

Il n'était dont pas évident que les spores de nos Champignons germeraient. Ces plantes ont au contraire très bien poussé et leur étude nous a donné quelques résultats importants.

Les spores de *Sterigmatocystis* sont semées sur jus de carotte, en tubes ordinaires, ou, pour avoir une masse liquide plus grande, en matras d'un demi-litre environ. Un récipient demeurant fixe, un autre est soumis à une agitation continuelle ; à part cela, les deux sont maintenus dans des conditions identiques.

Le tube ou le ballon destinés à être secoués sont suspendus de façon à pouvoir osciller autour d'un axe horizontal. Dans les premières expériences, nous produisions le mouvement en reliant par une attache quelconque un tube de culture ainsi disposé à l'interrupteur d'un fort électro-aimant (Pl. 17,E). Avec un ballon, ce n'était guère pratique ; nous avons eu recours alors au système suivant qui ensuite fut également employé pour les tubes. Le récipient est installé au voisinage d'une roue verticale mise en mouvement par un moteur à eau (Pl. 17) ; la roue porte deux tiges métalliques perpendiculaires à son plan, fixées excentriquement sur un même diamètre, de part et d'autre de l'axe. La monture du récipient est munie de deux tiges parallèles perpendiculaires à l'axe de suspension ; au repos, elles s'appliquent constamment sur les premières. Nous représentons d'ailleurs (fig. 1) un schéma de notre appareil qui en montre clairement le mécanisme. On voit que la roue, à chaque tour, imprime deux secousses au ballon : le liquide présente le même tourbillonnement que l'eau de mer dans les anfractuosités du rocher, avec plus ou moins d'intensité suivant la vitesse du moteur.

Nous avons procédé ainsi à vingt expériences ; un certain nombre n'ont duré que huit jours, d'autres deux mois : il fallait examiner la plante aux divers stades du développement.

Les conditions ne sont pas les mêmes avec le moteur qu'avec la bobine ; nous envisagerons successivement les deux cas.

Considérons un tube à essais ordinaire, lié à l'interrupteur de l'électro-aimant et renfermant quelques centimètres cubes de jus nutritif où l'on a semé des spores du *Stérigmatocystis*. Tout à côté, se

trouve, à la même température, à la même lumière, un tube fixe contenant autant de jus, ensemencé aussi. Le nombre des spores est à peu près le même dans les deux, grâce à la précaution prise de faire le semis au moyen d'un fil de platine que termine une boucle avec laquelle seule on touche la surface sporifère origine. La rapidité du mouvement, quand l'interrupteur se trouve ainsi surchargé, est beaucoup moins grande que s'il battait librement ; on peut compter les oscillations. La secousse n'est donc pas très violente.

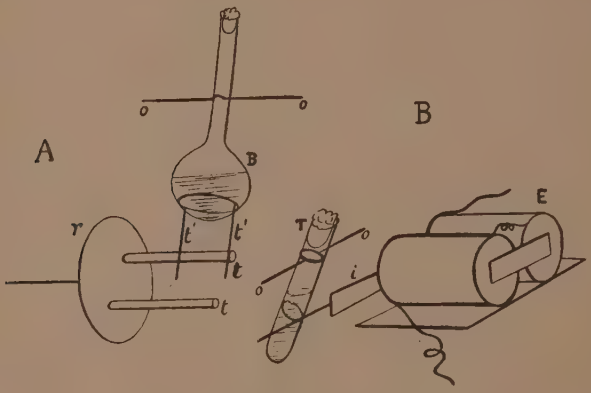


Fig. 1. — A. *Appareil pour agitation violente*. *r* : roue tournant sous l'action du moteur ; *t*, *t* : tiges horizontales fixées sur cette roue ; *t'*, t' : tiges fixées au ballon de culture B et s'appuyant sur les précédentes ; *o o* : axe de suspension du ballon. — B. *Appareil pour agitation faible*. E : électro-aimant ; *i* : son interrupteur muni d'une tige horizontale ; T : tube de culture mobile autour de l'axe *o o* et relié à cette tige.

Au bout de trois à quatre jours, on voit dans le tube mobile (Pl. 13, fig. 7) un certain nombre de *petites masses parfaitement sphériques*, d'un blanc jaunâtre, qui montent, descendent, courent en tous sens dans le liquide, tournant d'ailleurs sans cesse sur elles-mêmes ; leur vitesse est assez faible. La grosseur en est variable : les plus petites ont deux millimètres de diamètre, les plus grandes un demi-centimètre. Le tube fixe renferme quelques îlots superficiels, blanchâtres, avec de légères fructifications. Ces

dernières sont absentes dans le tube mobile ; en outre la quantité de champignon développée y est plus considérable, au moins double ; et encore toutes les spores semées n'ont pas contribué à la formation des sphères, car une assez grande partie de ces spores a été projetée sur la paroi, où elles ont produit un mycélium fructifié.

Donc, à l'examen extérieur, la culture agitée présente les caractères suivants, comparativement à l'autre :

Culture mobile. — Sphères de mycélium : quantité $2q$;

Culture fixe. — Ilots informes de mycélium fructifié : quantité q.

Si l'on coupe une des sphères de la culture mobile en deux moitiés et qu'on regarde la section, on y remarque : 1° une fine striation radiale partant du centre ; 2° deux zones concentriques, la plus intérieure brune, l'autre claire.

Les stries sont dues à la disposition des filaments mycéliens ; au centre de la sphère se trouve un amas d'une trentaine de petits corps arrondis, restes de spores ayant germé : de chacun part suivant le rayon un ou plusieurs filaments, abondamment ramifiés, surtout au voisinage de l'origine ; les rameaux les premiers formés sont aussi orientés dans le sens radial ; quant aux derniers, ils vont un peu dans toutes les directions, de quoi résulte une zone centrale assez enchevêtrée, la zone foncée. Les filaments sont cloisonnés en articles ; leur constitution ne présente pas de différence appréciable avec la culture fixe (Pl. 13, fig. 9).

Les sphères mycéliennes résultent par conséquent du développement d'un *groupe de spores* qui ont germé en filaments *dirigés en tous sens*, se ramifiant plus tard dans toutes les directions.

La culture que nous venons d'arrêter pour l'étudier, étant laissée au repos, produit du jour au lendemain de nombreux pieds sporifères sur le pourtour de ses masses sphériques. Il n'en est rien pour une culture identique maintenue dans son mouvement. Donc il y a retard dans la reproduction, retard que la plante tend pour ainsi dire à rattraper sitôt le mouvement supprimé.

Prenons maintenant un tube où la culture est âgée de huit jours. La seule différence est une grosseur plus considérable des sphères, un enchevêtrement plus grand des filaments.

Enfin, dans une culture plus âgée encore, paraissent des fructifications. Nous les décrirons tout à l'heure.

Quand on emploie le moteur hydraulique, les secousses du liquide sont relativement violentes. Cette fois, sans introduire plus de spores, on obtient de très nombreuses sphères, car les spores se divisent en groupes plus petits ; mais les sphères sont bien moins grosses que dans les tubes faiblement secoués au bout du même temps (Pl. 13, fig. 8).

Cinq jours après le semis, à part les différences indiquées à l'instant, ces sphères sont tout à fait de même nature que les précédentes. Quinze ou vingt jours plus tard, leur aspect se modifie.

Au lieu de présenter une surface mate et veloutée, elles sont lisses, assez brillantes, ressemblent à de petites boules d'ivoire ; elles ont une grande élasticité : fortement écrasées avec une pince, elles reprennent de suite leur forme. Après un mois, les plus grosses mesurent seulement deux millimètres et demi tandis qu'elles atteignaient un centimètre auparavant.

La sphère d'un mois offre des particularités importantes. Les filaments ont produit, en s'entremêlant, un tissu très compact, un *véritable stroma, bien plus serré que le stroma d'une culture fixe*. Sur les bords pourtant, les extrémités des hyphes affectent une disposition radiale fort nette. En outre, le cloisonnement s'est très développé : un fragment de mycélium montre jusqu'à six cloisons rapprochées, alors que dans le même volume de la plante en culture fixe ou faiblement agitée, on ne trouvait qu'une cloison ou point du tout. Le nombre des noyaux par article a diminué, c'est une *tendance à la structure cellulaire*. Enfin, l'*épaisseur de la membrane* s'est accrue notablement.

Tout cela se manifeste dans un tube ou dans un ballon, mieux accentué en ce dernier cas, la masse de liquide étant considérable.

Quant au récipient fixe, la surface du liquide y est uniformément blanche ; le champignon a produit d'abondantes spores, son thalle est une peau épaisse, flottante, limitée par le verre ; au dessous, un mycélium lâche formant des flocons dans le sein du milieu.

Mais, avons-nous dit, sur la plante en culture agitée, apparaissent aussi des fructifications ; seulement elles sont invisibles à l'œil nu, dissimulées dans le tissu de la sphère. Examinons-les dans une culture fortement secouée. On voit au microscope des filaments gros et courts par rapport aux pieds sporifères du jus

fixe, assez tortueux, se terminant en tête renflée munie de basides et stérigmates ; ceux-ci portent quelques spores. Les dimensions sont : diamètre de la tête 29 μ ; longueur des basides 14 μ ; longueur des stérigmates 7 μ, *diamètre des spores 3 μ, 1* (Pl. 13, fig. 10). La structure offre des particularités remarquables. La membrane du pied est en moyenne deux ou trois fois plus épaisse qu'à l'ordinaire ; cette épaisseur n'est pas uniforme : en certaines régions, des proéminences cellulosiques renforcent la paroi, souvent même la cavité se trouve presque complètement obstruée. Cela se manifeste à un plus haut degré encore dans la tête. D'autre part, la cavité du pied est coupée de fréquentes cloisons : on peut compter jusqu'à 23 cloisons sur une longueur d'un quart de millimètre ; ces cloisons sont à membrane assez épaisse et point planes, courbées soit en avant, soit en arrière, ce qui correspond à un développement exagéré de cet appareil de soutien. Les basides sont renforcées aussi chacune par une cloison transversale. Enfin les spores ont une paroi plus forte que d'habitude. Donc, l'appareil reproducteur présente, comme le thalle, un grand développement de la cellulose. En somme, *fructification tardive*, gênée pour ainsi dire dans son apparition, se montrant d'ailleurs mal, entre les hyphes du thalle, mais *solidement édifiée*, enfin *peu féconde*. Nous ajouterons cependant que si les premières têtes sont toujours cachées à l'intérieur du tissu, plus tard il en émerge à la surface ; mais nous ne les y avons jamais vu paraître qu'en un point de la sphère, où elles formaient ensemble une petite saillie brune. Ce qui vient d'être dit se rencontre, très atténué, sur une culture moins fortement agitée.

Nous allons maintenant reconnaître quelque chose de plus. Beaucoup de sphères ont à leur surface un point noir, gros comme une tête d'épingle. C'est un petit corps très dur, solidement encastré dans le stroma. Si on l'écrase, on trouve que l'intérieur, brun clair, est un vrai parenchyme sans méats, formé de cellules polygonales, à paroi très épaisse, à cavité peu régulière ; ces cellules sont isodiamétriques, d'une dimension moyenne de 10 μ. (Pl. 13, fig. 11). A la périphérie, la membrane est simplement plus épaisse et cutinisée. Une pareille formation est comparable à ce qu'on appelle un sclérote ; seulement, les caractères du sclérote, tissu pseudo-parenchymateux serré, membranes épaisses, sont exagérés ici, et de plus le phénomène est précoce. Mais c'est la suite du processus qui se

manifeste jusqu'à présent par l'acquisition d'un stéréome développé ; c'est la naissance d'une *forme résistante de conservation*. Un certain nombre de sphères portent plusieurs sclérotes ; d'autres plus brunes, en ont même dans leur intérieur. La culture fixe de même âge n'a pas de sclérotes ; mais il en apparaît beaucoup plus tard, quand elle vieillit sur le substratum épuisé. Le nombre des sclérotes augmente dans le récipient mobile assez rapidement, et lorsque la culture est âgée de deux mois, toutes les sphères ont des points noirs.

A partir de l'instant où les sclérotes ont apparu, l'activité de croissance s'est ralentie ; si l'on compare une semaine après le ballon fixe et le ballon mobile, la masse de champignon n'est guère plus considérable dans celui-ci que dans le premier. Plus tard, la culture mobile ne semble pas se développer davantage, tandis que l'autre s'accroît toujours, avec plissement du stroma. Enfin, quand trois mois se sont écoulés, leur état demeure stationnaire.

Nous sommes donc arrivés aux résultats suivants :

1° Un Champignon est susceptible de se développer dans un liquide en mouvement ;

2° Le *thalle* prend la forme sphérique.

Les filaments sont d'abord dirigés suivant les rayons de la sphère, ils se ramifient ensuite en tous sens. Le système de soutien est très développé (stroma serré, nombreuses cloisons).

Il y a tendance à la structure cellulaire.

3° *L'appareil reproducteur* apparaît tardivement.

Il est mal formé, peu abondant.

Il présente un système de soutien très développé (membranes épaisses, cloisons).

Les spores, peu nombreuses, ont les dimensions du type origine.

4° Une *forme de conservation résistante* apparaît de bonne heure.

5° *La plante croît d'abord très vite*, produisant une quantité de matière plus grande qu'une culture fixe. *La croissance se ralentit bien plus tôt* et devient très faible, la culture fixe prenant le dessus.

Conclusions relatives à ces résultats.

Les conditions de vie que nous venons d'imposer au *Sterigmato-*

cystis sont évidemment très nouvelles pour lui et de nature à faire varier profondément les caractères de forme et de structure qui en sont susceptibles.

On constate que cette variation s'est manifestée avec les mêmes degrés que précédemment, et cela vient confirmer nos conclusions à ce point de vue.

Maintenant, pour ce qui est non plus de la variation en soi, mais du rapport entre le milieu et elle, il y a des conclusions nouvelles à tirer.

1° *L'agitation du milieu accroît la résistance de la plante.*

On sait, à vrai dire, que les plantes côtières, les animaux côtiers ont des organes de protection et de soutien solides. Mais ici nous montrons expérimentalement l'action du milieu. Il y a, de bonne heure, un stroma très complexe : ce n'est pas, comme on pourrait le croire, un pelotonnement serré des hyphes causé par le simple tourbillon, phénomène qu'on réaliserait en secouant longtemps ensemble dans un liquide des débris organiques filamenteux ; c'est le résultat d'une ramification abondante, produisant un tissu compacte résistant aux chocs du liquide. Plus l'agitation est faible, ou moins la masse liquide est grande, moins le stroma est développé ; c'est ainsi que dans un tube à essais, nous avons obtenu des sphères très molles tandis que dans un ballon c'étaient des sphères très fermes. La membrane est épaissie, les cloisons sont nombreuses : c'est l'acquisition d'un tégument plus efficace, d'un squelette moins fragile, provoquée par les frottements et les chocs.

Le retard dans la production de têtes sporifères, qui dans la culture fixe se dressent déjà en nombre, est évidemment une conséquence de l'incompatibilité entre le mouvement et l'existence d'un édifice aussi fragile. Il s'en fait d'abord sur la limite même de la sphère : ce ne sont pas les premières ainsi apparues qui fructifient ; elles avortent. Ceci ayant comme un retentissement sur le reste de l'organisme, il ne continue plus à s'en produire aussi près du bord ; elles naissent plus profondément, acquérant basides et spores, peu nombreuses d'ailleurs. L'appareil reproducteur du *Stérigmatocystis* est un appareil aérien, qui se développe mal dans l'intérieur des tissus. Les sclérotes sont une tendance vers un autre mode de reproduction ; en effet, beaucoup de moisissures

analogues à celle que nous avons étudiée sont douées de ce qu'on appelle forme parfaite, périthèce avec asques : un stade du développement de ce périthèce est souvent un sclérote, tout au moins par la structure, sinon par les propriétés physiologiques.

2° L'agitation du milieu, en tant que cause de chocs et frottements, joue donc un rôle important, mais nous avons en secouant nos récipients introduit d'autres conditions que ces chocs et frottements.

a) Le milieu nutritif se renouvelle sans cesse autour de la plante : c'est une cause de meilleure croissance. Il est vrai que par contre les « excreta » sont, pour les mêmes raisons, constamment ramenés au contact de cette plante. Voilà une cause de moins active croissance. Nous ne savons si les deux actions inverses se compensent.

b) Ceci nous amène à considérer le facteur le plus important qui soit en jeu dans cette expérience, après toutefois celui que nous avons examiné en premier lieu ; c'est *l'égalisation* du milieu tout autour de la plante qui se développe.

Envisageons une spore germant dans le liquide en mouvement, supposons-la isolée : l'aliment est le même tout autour, l'éclairement aussi, enfin l'influence que peut avoir la direction constante de la pesanteur est supprimée. Si la spore pouvait se développer par tous ses points, elle donnerait tout autour d'elles des filaments semblables : sa croissance est limitée à un ou deux points, il se produit un ou deux filaments, mais ceux-ci pouvant croître par toute leur surface se ramifient dans les directions quelconques : cela donne un ensemble sphérique formé de filaments rayonnants. Nous avons en réalité un petit amas de spores ; on peut le considérer comme une spore plus grosse pouvant germer en un plus grand nombre de points : le résultat sera le même. La partie centrale de la sphère se complique par des ramifications de deuxième, troisième, n^e ordre des filaments en tous sens : la disposition radiale s'efface, mais est toujours visible sur les bords.

La forme sphérique est donc le résultat de l'égalité des conditions extérieures. La structure même s'oppose à ce que l'on voie là simplement l'effet d'une action mécanique. La chose est particulièrement frappante dans le cas d'une culture en tube faiblement agité.

La part de la pesanteur dans les considérations qui précèdent

est difficile à mettre en évidence. Il est plus aisé de montrer en quoi le changement continuel d'orientation par rapport à cette force intervient pour un autre effet.

c) Nous avons insisté sur la *rapidité de croissance* de la culture pendant les premiers jours.

Il faut l'attribuer partiellement à l'influence ou plutôt la non influence de la pesanteur en tant que force de direction constante.

En effet des expériences répétées nous ont prouvé que la pesanteur, par ce fait, *retarde la croissance* de la moisissure. Ce fait ne nous semble pas avoir été jamais démontré.

Suppression de la direction constante de la pesanteur. — Deux cultures identiques sont disposées l'une sur roue verticale tournant lentement d'un mouvement uniforme, l'autre à côté, mais immobile : il n'y a d'autre différence entre elles que la rotation. Nous avons constaté une croissance plus rapide de la première, soit à la germination, soit au développement ultérieur. Voici de quelle manière a été réalisée l'identité des deux cultures. Nous nous sommes servis de chambres humides pour observer des germinations, de tubes ordinaires pour avoir des cultures avancées.

Deux chambres humides destinées à être comparées reçoivent sur leurs lamelles deux gouttes égales d'un liquide contenant des spores en suspension qui s'y trouvent répandues d'une façon homogène ; il y a ainsi un même nombre de spores dans chaque. Le liquide est de la gélatine nutritive maintenue à 25 degrés, qui se solidifie une fois déposée dans la chambre. Cela exige une gélatine assez aqueuse, afin qu'elle soit liquide à température peu élevée et qu'ensuite elle constitue un substratum suffisamment humide ; car il ne faut pas songer à mettre d'eau dans le fond de la chambre, on introduirait des perturbations dans l'expérience. Enfin, on comprend que, pour les mêmes raisons, il faille un milieu solide. Il est facile de vérifier par un examen microscopique l'égalité du nombre des spores déposées ; de plus, si l'on a pris le soin de ne pas mettre trop de spores dans le liquide origine et de bien agiter celui-ci pour les séparer, les deux gouttes renferment des spores isolées les unes des autres. Les cultures sont donc identiques. Naturellement, pour chaque expérience, nous avons préparé une dizaine de cellules destinées à la roue, et autant destinées à

être laissées au repos. Il importe, dans cette préparation, d'ensemencer alternativement une chambre mobile et une chambre fixe ; on a ainsi égalité plus certaine entre les deux lots. L'emploi des tubes ordinaires de culture est moins compliqué. On peut se contenter de deux tubes, parfaitement égaux ; dans chacun d'eux, alternativement l'un et l'autre, on dépose des gouttes toujours égales du liquide chargé de spores. Enfin puisque, comme M. Elfving l'a montré (1), la lumière exerce une influence sur la vitesse de croissance des Champignons, et que d'autre part il est difficile d'éclairer également les cultures fixes et les cultures mobiles, on place le tout dans l'obscurité : pour les tubes en particulier, rien n'est plus aisé, on les enveloppe d'un fort papier. La roue a été simplement reliée par une transmission à l'axe du moteur hydraulique (Pl. 17).

Les résultats auxquels nous sommes arrivés dans une expérience prise comme exemple sont, cinq jours après le semis :

		Nombre de spores germées.
Culture mobile	75	37 ayant produit un tube germinatif long. 38 » » » » court.
Culture fixe	14	9 ayant produit un tube germinatif long. 5 » » » » court.

De plus, la longueur des hyphes est moindre dans le second cas que dans le premier.

Il s'agit là de cultures en cellules. Dans les tubes, nous avons laissé le Champignon pousser quinze jours ; alors chaque goutte était le siège d'une colonie mycélienne : les colonies dans le premier cas avaient un diamètre plus grand que dans le second.

L'influence de la pesanteur est donc partiellement mise en évidence.

II.

Culture dans un liquide agité en présence d'un obstacle.

Nous reportant toujours aux conditions dans lesquelles vivent les plantes et animaux des côtes, nous avons cherché à réaliser un milieu où, en plus de l'agitation du liquide, il y eût quelque chose

(1) *Studien üb. d. Einwirkung d. lichtes auf d. Pilze;* Helsingfors, 1890.

qui correspondît par exemple au rocher sur lequel souvent est fixé l'organisme marin. Dans l'expérience précédente, la paroi du verre ne remplit nullement ce rôle. Il arrive pourtant parfois que des spores rejetées hors du liquide demeurent attachées à cette paroi, y germent, produisent un mycélium, mais bientôt le tout est balayé et rentre dans le tourbillon. Nous avons ici disposé dans le jus de carotte que contient le récipient, tube ou ballon, un morceau de bois fixe : il suffit que ses extrémités touchent le fond et le bouchon. L'agitation est produite de la même façon ; une culture fixe identique est installée au voisinage. Au bout de huit jours, la surface du bois, dans la portion immergée et dans celle qui se trouve simplement battue sans être constamment recouverte, porte un feutrage grisâtre très-abondant ; quand il n'est point baigné par le liquide, la nature filamenteuse n'en apparaît point, on dirait une gelée compacte. La partie du bois qui reste toujours à sec a reçu par projection un grand nombre de spores, elle est déjà couverte de jeunes fructifications blanches. Dans le ballon fixe, la surface du liquide est voilée d'un stroma fructifié, qui remonte légèrement sur le bois. Quinze jours plus tard, l'aspect de la culture mobile revêt un caractère plus accusé : il y a comme des panaches de filaments fixés au bois (Pl. 13, fig. 13) et tout le temps secoués, se rabattant sur le support quand celui-ci est à sec. La ressemblance de forme est frappante avec des algues, des *Ectocarpus* par exemple.

Les filaments sont agrégés en cordons ramifiés desquels se détachent latéralement d'abondantes hyphes isolées. Ces cordons sont solides, se rompent difficilement, et sont fortement attachés au bois. Au point de vue de la structure du filament, nous constatons simplement qu'il est long, étroit, parfaitement cylindrique, de même calibre sur toute son étendue, peu cloisonné, peu ramifié. Les fructifications n'ont pas apparu sur cette forme du thalle.

Ce résultat est intéressant d'abord par la *fixation de la plante*. Les spores se sont pour la plupart accrochées à la surface rugueuse du bois et les filaments issus d'elles se sont pour ainsi dire cramponnés au support. Certes, beaucoup de spores sont restées dans le liquide, beaucoup, même après germination sur le bois, ont dû en être arrachées ; aussi a-t-on une certaine masse de champignon libre, mais sans forme caractérisée, précisément à cause des perturbations introduites par la présence du bois. Il n'en est pas

moins vrai que l'agitation en présence d'un obstacle susceptible de servir de support a déterminé une fixation solide.

En second lieu, la *forme nouvelle* qu'a prise le Champignon est également d'un véritable intérêt. Une autre que celle-là pouvait à priori être déterminée par l'action du milieu, la forme d'une croûte étroitement appliquée contre le support. Peut-être l'aurait-on obtenue par des secousses plus violentes. Quoi qu'il en soit, nous avons une adaptation nette au nouveau genre de vie, corps résistant, souple. Nous ne croyons pas que jamais un champignon ait présenté les caractères que nous venons de décrire. Ce sont tout à fait des caractères d'algues.

D'ailleurs nous reviendrons un instant à ce propos sur la forme sphérique obtenue précédemment pour signaler sa ressemblance avec certaines algues, ces algues marines plus ou moins sphériques résultant du développement d'un individu dans toutes les directions, qu'on a nommées « Ægagropiles ».

Enfin, *l'absence complète de fructification* est une chose importante à signaler. L'appareil sporifère habituel n'a pu se former et s'il nous avait été permis de poursuivre plus loin ces expériences, peut-être aurions nous vu apparaître un nouvelle appareil reproducteur.

III.

Cultures en tubes hermétiquement fermés.

Après avoir modifié le substratum de la plante, il était naturel de chercher à modifier l'atmosphère où elle vit. Nous nous sommes bornés à imposer à la plante cette condition, de se contenter d'un *volume limité d'air*.

Nous avons fait de nombreuses cultures dans des tubes ordinaires, qu'aussitôt après le semis nous fermions hermétiquement : pour cela, il suffisait d'enfoncer le bouchon d'ouate et de verser de la paraffine dans la partie supérieure du tube.

Comme il était évident *a priori* que le Champignon pousserait *d'abord* moins bien que dans un tube ouvert, nous nous sommes adressés seulement aux meilleurs milieux nutritifs : carotte, pomme de terre, gélatine.

Si l'on compare à une culture en tube non fermé, on constate, après un développement plus lent :

1° Un aspect pulvérulent de la culture, dû à la ténuité des fructifications ;

2° Une réduction de toutes les dimensions ;

3° L'apparition précoce de sclérotes, très petits et très noirs ;

4° Une quantité moins considérable de champignon produite.

En somme, une *réduction générale* : le Champignon du tube fermé est à celui du tube ouvert ce que la plante naine des montagnes est à celle des régions basses.

IV

Cultures dans des récipients de grandeurs variées.

Enfin le vase lui-même où l'on fait la culture est susceptible d'être modifié. On peut le prendre grand ou petit, par exemple, et ce n'est pas sans influence. Les conditions d'observation ont besoin d'être précisées particulièrement.

Nous comparons deux tubes, un tube à essais ordinaire et un tube de diamètre trois fois plus grand. Tous deux contiennent du jus de carotte, le second plus que le premier ; on a semé dans chacun la même quantité de spores. Quelques jours après l'ensemencement, chaque tube renferme un *petit* îlot mycélien couvert de fructifications, le jus est loin d'être épuisé de part et d'autre ; les deux îlots sont égaux, autant qu'on peut en juger à l'œil, les fructifications sont en même quantité, l'aspect est identique.

Cependant nous allons observer des différences dans la structure du mycélium ; les *articles*, dans le gros tube, sont *plus longs et plus larges*, et d'une façon très sensible ; 1 étant la dimension en longueur d'un filament du petit tube, 1 + 1/3 sera la dimension dans l'autre (Pl. 15, fig. 22, — Cultures sur gélatine).

Avant de nous demander à quoi attribuer ce résultat, disons de suite que cette expérience montre combien grande est la variabilité des éléments du thalle, pour qu'une influence certainement aussi faible ait pu avoir une telle action.

Quelles sont maintenant les causes qui ont agi ? Les différences

entraînées par l'inégalité de volume des tubes sont les suivantes :

1° Le gros tube renferme une quantité plus grande de jus de carotte, d'où il résulte :

a) Un poids d'aliment plus considérable ;

b) Une répartition dans un espace plus grand des substances excrétées et nuisibles au développement.

2° Il y a dans le gros tube, un volume d'air plus grand, d'où résulte une répartition de l'acide carbonique dégagé dans un espace plus étendu.

Or, cette dernière condition n'entre pas en jeu ; en effet, les différences observées dans la structure se maintiennent identiques lorsque les volumes d'air sont égaux, qu'il s'agisse de tubes bouchés ou de tubes ouverts ; elles s'effacent au contraire quand, les volumes d'air étant inégaux, les poids de jus sont les mêmes.

C'est donc la première condition qui détermine le phénomène

Chapitre III.

ADAPTATION. — DÉSADAPTATION. — ÉVOLUTION D'UNE CULTURE D'UN ORDRE DÉTERMINÉ.

I.

Etudions maintenant comment un caractère nouveau s'établit. Considérons par exemple le cas de notre première culture. Nous avons recueilli des spores d'un *Sterigmatocystis alba* sur du fromage moisi, nous les avons semées dans une solution de glucose : il a été obtenu de la sorte la culture d'ordre 1 relative à ce milieu. Au bout de quinze jours seulement des fructifications ont commencé à paraître tandis que les têtes sporifères se montrent au troisième jour quand on répand des spores sur le fromage. Examinons la plante à ce moment où elle devient complète. Le thalle, peu étendu, est constitué par un mycélium dont les articles ont des dimensions intermédiaires entre celles de la culture origine et celles qui ont été données dans le chapitre premier relativement à la culture sur glucose.

L'appareil reproducteur rappelle assez nettement la forme primitive ; le pied seul est différent ; c'est un filament du calibre ordinaire des hyphes mycéliennes moins cloisonné pourtant que celle-ci, et dressé : il porte (Pl. 14, fig. 15) un gros renflement terminal, avec basides, stérigmates et chapelets de spores, mais il y a une certaine indétermination dans la forme et les dimensions des basides et stérigmates. En outre, les diverses têtes ne se ressemblent pas ; il y en a de moins modifiées par rapport à la forme primitive, et de plus rapprochées de la forme finale. Donc, dans cette culture d'ordre 1 ou première culture, pas de pied différencié, indétermination de la tête, des basides et stérigmates.

Recueillons les spores pour les semer dans un tube nouveau de la même solution de glucose. C'est la culture d'ordre 2, ou

deuxième culture. Faisons une troisième culture : dans celle-ci, dès le dixième jour, nous aurons une plante plus développée que dans la première culture après quinze jours. Le thalle est plus abondant, les fructifications aussi ; de plus, il y a des différences dans leur constitution avec la première culture : les articles tendent nettement vers une forme cylindrique courte ; l'appareil reproducteur est constitué par un filament dressé encore, moins différencié en pied que dans le cas précédent, et à peine renflé au sommet ; mais il porte quatre ou cinq grosses proéminences arrondies (Pl. 14, fig. 16), munies de stérigmates avec spores, et ces spores ont toujours le même diamètre. La tête commence donc à s'effacer, après le pied ; les basides et stérigmates, ces replis de premier et deuxième ordre du renflement terminal, ont pourtant subsisté, et la propriété du sommet du pied s'est pour ainsi dire reportée sur les replis de premier ordre. On ne rencontre plus ici les fructifications observées dans la première culture.

Continuons à faire des reports sur tubes frais. Quand nous arrivons à la sixième culture, nous obtenons dès le huitième jour un développement encore plus abondant que dans la troisième culture au dixième jour, et cette fois l'appareil reproducteur a la forme décrite plus haut comme caractérisant une culture sur glucose. Les basides et stérigmates se sont effacés, il ne reste plus que les chapelets de spores insérés au sommet d'un filament dressé. A partir de maintenant, toutes les cultures d'ordre plus élevé montrent les mêmes caractères. Pourtant la neuvième se développe un peu plus vite que la huitième, la dixième un peu plus vite que la neuvième, mais les différences de temps décroissent graduellement : il arrive un moment où toutes les cultures d'ordre successif sont identiques.

Voilà, dans le cas de notre Champignon, un résultat semblable à celui que Wasserzug a obtenu avec *Micrococcus prodigiosus* : cette Bactérie était devenue un Bacille au bout de *quinze* cultures. C'est également une variation héréditaire que M. Laurent a réalisée dans le Bacille de Kiel rendu incolore par l'exposition à la lumière.

L'ensemble des phénomènes que nous venons de décrire constitue *l'adaptation* du *Sterigmatocystis* à la vie dans un jus sucré et la *désadaptation* par rapport au milieu primitif. Il a fallu six cul-

tures pour que le Champignon prenne sa forme définitive. Dans la première, la spore semée tend à produire une plante ayant les caractères de celle qui l'a engendrée, mais ces caractères ne sont pas en rapport avec l'aliment fourni et les nouvelles conditions physiques. Reportons-nous à l'époque où une spore, venue d'une origine quelconque, est tombée sur le fromage moisi, se trouvant alors dans les conditions qui ont fait le *Sterigmatocystis alba*. Supposons que cette spore soit, au lieu de cela, tombée dans une solution de glucose ; elle n'aurait pas donné le *Sterigmatocystis alba*, elle n'aurait pas donné non plus la forme que nous avons décrite relativement au glucose.

En somme, étant considéré la spore, *S*, apportant en elle certaines tendances, on peut écrire :

$$S \rightarrow \begin{cases} \text{Fromage : } \textit{Sterigmatocystis alba.} \rightarrow \text{Glucose : forme } F. \\ \text{Glucose : Forme } \Phi. \end{cases}$$

F est une forme participant de Φ et du *Sterigmatocystis alba*. La forme que prend un être introduit à l'état de spores dans un milieu déterminé est le résultat des tendances héréditaires apportées par le germe et des conditions où peuvent s'accomplir les phénomènes vitaux dans le milieu nouveau.

Les deux actions se combinent, l'une tendant à produire une forme, l'autre une forme différente ; on arrive à un état d'équilibre. Cet état d'équilibre présente la particularité suivante : sa stabilité varie avec le temps. Ainsi, recueillons des spores de la huitième culture sur glucose, et semons-les sur fromage. Le Champignon se développe, mais moins vite que si notre semis provenait d'une plante ayant poussé sur le fromage : au lieu de fructifier en trois jours, il fructifie au bout de cinq jours seulement et encore ne donne-t-il pas la forme primitive. Mais les spores issues de cette première culture donneront en quatre jours une plante fertile, bien mieux développée d'ailleurs, et plus semblable au *Sterigmatocystis alba*. Au bout de trois cultures, nous aurons de nouveau ce dernier. Faisons la même opération en partant de la dixième culture de la forme *F*, il faudra au moins quatre reports pour retrouver le stérigmatocyste blanc. Le retour à la forme première est d'autant plus difficile que nous nous adressons à une culture d'ordre plus élevé de la forme *F*. Nous voyons d'autre part qu'il faut

moins de temps pour revenir au *Sterigmatocystis alba* en partant de *F* qu'il n'en a fallu pour l'inverse.

En résumé, dans l'exemple que nous avons pris, se manifestent les phénomènes suivants :

1° Pendant huit cultures successives, le Champignon *varie progressivement* de la forme *Sterigmatocystis alba* à la forme *F* ; à chaque culture, le développement demande un certain temps, différent du temps correspondant à la culture origine, et la durée du développement va sans cesse en décroissant ;

2° A partir de la huitième culture, *la forme F est d'autant plus stable que l'ordre est plus élevé* ;

3° Les caractères ont varié dans l'ordre suivant :

a) Forme du pied ;
b) Tête renflée ;
c) Dimensions des basides et stérigmates ;
d) Présence de tête, basides et stérigmates.

Les dimensions des spores sont restées constantes pendant toute la période de transition.

Ces résultats n'étaient pas évidents à priori, comme on pourrait le croire. En se bornant aux hypothèses, sans faire d'expériences, on pouvait aussi bien supposer qu'à la première culture sur glucose, il se produirait tout simplement un développement moindre, avec même appareil reproducteur (sinon avec un thalle semblable, à cause du contact intime de ce dernier avec le substratum) ; et de même aux cultures suivantes, jusqu'à l'apparition d'une forme reproductrice nouvelle, définitive, susceptible de suppléer la première. On pouvait supposer encore que l'adaptation consistait en un ralentissement considérable du développement lors du premier semis pour aboutir, sans qu'il soit nécessaire de pratiquer un deuxième semis, à la forme reproductrice nouvelle seule possible dans le milieu nouveau. Il est remarquable de voir au contraire *une série de formes reproductrices* nettement définies et fertiles. De plus il est intéressant d'assister pour ainsi dire à l'action du milieu ; et la marche de cette action, en train de se produire, nous éclaire aussi bien sur la valeur des caractères de structure que l'a fait le résultat définitif.

Pour certains milieux, il suffit de une ou deux cultures succes-

sives, qui ont d'ailleurs un développement plus rapide que dans le cas précédent, pour arriver à la forme correspondante ; il en est ainsi dans le cas des cultures sur carotte, pomme de terre, gélatine ; les mêmes lois s'observent au cours de l'adaptation ; la vitesse est simplement plus grande.

Pour d'autres, les sels minéraux par exemple, la vitesse d'adaptation est plus faible, notamment dans l'emploi du phosphate d'ammoniaque. La première culture, au bout de cinquante-deux jours, n'avait donné qu'un très léger stroma, formant couronne autour du tube, avec une fructification très ténue. La dixième culture, quarante-trois jours après le semis, produisait déjà un stroma consistant recouvrant une bonne partie de la surface liquide, fructifié aussi. A la douzième, dès le trente-neuvième jour, le développement était plus abondant encore. Ajoutons que progressivement on tendait vers la forme définitive, presque établie dans la douzième culture.

Enfin, dans le cas des sucres, de l'amidon, la vitesse d'adaptation est intermédiaire entre ces deux extrêmes.

Cette vitesse est fonction de deux variables : le nombre des cultures nécessaires pour arriver à l'état d'équilibre, la durée du développement de chaque culture. Chacune de ces variables dépend de deux facteurs; la nature de la spore semée (son passé), la nature physique et chimique du milieu. On ne voit pas un rapport immédiat entre les deux variables ; si l'on ralentit le développement par un moyen quelconque, on ne trouve pas qu'il faille moins de cultures ; les milieux à développement lent ne demandent pas un nombre de cultures plus petit, un développement rapide n'entraîne pas un grand nombre de cultures.

Pour tous les milieux, on remarque que le retour au milieu primitif ne demande pas le même temps que le chemin inverse ; tantôt le retour est plus rapide, tantôt il est plus lent; nous n'avons pu établir de loi générale.

En résumé :

1° L'adaptation du *Sterigmatocystis alba* se fait par *une série de formes successives fertiles.*

2° La variation suit la marche que nous représentons par ce tableau :

Thalle	*Appareil reproducteur*
Dimensions.	*a*) Dimensions des divers organes. *b*) Différenciation du pied ; en se modifiant, elle fait varier les dimensions de la tête, des stérigmates et basides, le nombre de ceux-ci. *c*) Tête renflée ; sa disparition est suivie des mêmes effets. *d*) Deux ordres de replis, stérigmates et basides.

Plaçons en regard le résultat fourni par l'examen des cultures fixées ; désignons par α les caractères variant souvent, par β ceux qui ne varient pas souvent, et par γ ceux qui ne varient jamais.

Thalle	*Appareil reproducteur*
α) Dimensions.	α) Dimensions. β) Différenciation du pied. Tête renflée, avec stérigmates et basides.
γ) Filaments. Articles.	γ) Filament dressé. Ramification terminale. Chapelet de spores. Volume des spores.

Ces deux tableaux peuvent nous conduire à formuler cette conclusion :

Pour le thalle, la forme filamenteuse, la structure articulaire sont les deux premiers caractères acquis, dominant tous les autres.

Pour l'appareil reproducteur, il y a d'abord eu des filaments dressés, se ramifiant au sommet en chapelets de spores ; puis se sont développées des têtes sphériques avec deux ordres de replis. Enfin le filament dressé s'est différencié, ce qui a déterminé le nombre et les dimensions des organes apparus.

Nous retraçons ainsi l'histoire de la plante par l'examen de ses variations.

II.

Jusqu'à présent, nous avons étudié des cultures arrivées à leur entier développement, c'est-à-dire produisant des spores, en d'autres termes des plantes adultes.

Nous aurons complètement terminé l'examen de la moisissure dans ses divers états quand nous aurons considéré l'évolution d'une culture, la série des phénomènes compris entre la germination et l'épuisement complet du substratum.

Deux points y sont intéressants :

1° Le développement d'une tête sporifère ;

2° L'apparition de sclérotes dans une culture vieille.

1° Développement d'une tête sporifère.

Prenons par exemple le cas de la culture sur carotte. Il s'élève du thalle un gros filament cloisonné, d'abord de même calibre sur toute son étendue ; ce filament se renfle à son sommet et la tête ainsi formée bourgeonne sur toute sa surface : les basides naissent ; bientôt sur elles se dressent des stérigmates.

On voit que ce développement ne reproduit pas exactement l'évolution dans le temps ; il y a *renversement dans l'ordre de certains stades* (tête, pied).

Pourtant le développement d'une culture sur pomme de terre nous offre le phénomène suivant, très remarquable. A la surface du thalle se forment d'abord des fructifications comme celles que représentent les fig. 3 et 4 de la pl. 12 ; c'est la *reproduction exacte de la phylogénie*, avec arrêt à un stade éloigné encore de l'état actuel : ces fructifications, en effet, ne sont point stériles. Plus tard, d'ailleurs, apparaissent les têtes sporifères normales, par le même processus que pour la carotte.

Voilà les seuls faits sur lesquels nous devions appeler l'attention dans l'ontogénie de la plante.

2° Apparition de sclérotes.

Les sclérotes se forment sur les points de la culture où le milieu commence à s'épuiser, ou tout au moins en des régions de la plante

dont les fructifications ont produit toutes leurs spores. Dans des cas exceptionnels, comme celui des liquides agités, nous les avons cependant obtenus quand la plante était encore jeune ; il a été dit comment on peut l'expliquer. Quand on les trouve sur un thalle âgé, ils ont une constitution assez différente (Pl. 13, fig. 12). Ce sont des corpuscules plus ou moins ronds, pouvant atteindre un millimètre de diamètre, bruns foncés, résistant à l'écrasement. La périphérie est formée d'un stroma noirâtre simplement un peu plus compact que le stroma du thalle, et à parois cutinisées ; tout le reste de la masse est un pseudoparenchyme d'articles gros et courts à parois épaisses demeurées cellulosiques. L'origine filamenteuse de ce parenchyme est par endroits très visible.

Les sclérotes se développent soit dans l'épaisseur du milieu nutritif, soit à la surface. Plus la culture vieillit, plus ils sont nombreux. Quand le milieu est complètement épuisé, la plante se réduit aux sclérotes et l'ensemble des spores. Nous en avons rencontré sur tous les milieux, sauf les sels minéraux ; dans ce dernier cas, ce n'est peut-être qu'un retard, dû à la lenteur de l'évolution. Sur les matières amylacées, le riz, l'amidon, la pomme de terre, ils se montrent plus tôt que partout ailleurs et en plus grand nombre. Nous avons conservé toutes nos cultures, les sclérotes n'ont pas encore évolué ; il se pourrait que ce soit là un stade d'une forme reproductrice parfaite.

Tel est l'ensemble de nos observations sur le *Sterigmatocystis alba*.

Les résultats obtenus ont leur utilité pour la classification. Si nous en tenons compte pour d'autres Champignons ou si nous procédons sur celles-ci au même travail, il sera aisé de faire un groupement naturel.

D'autre part, la variabilité des caractères nous suggère une remarque importante. Les spores étant toujours emportées d'un milieu sur un autre, une forme trouvée est une forme passagère ; nous ne sommes jamais sûrs de la retrouver plus tard. Maintenue sur son milieu, elle peut demeurer indéfiniment constante.

Chapitre IV.

CULTURES D'AUTRES ESPÈCES.

Nous avons étudié par les mêmes méthodes deux autres formes appartenant également au genre *Sterigmatocystis* : ce sont par conséquent des plantes à thalle filamenteux articulaire, se reproduisant par têtes sporifères munies de basides et stérigmates avec chapelets de spores.

La première a été trouvée dans un tube de carotte contaminé accidentellement. Son thalle est constitué par un mycélium blanc rosé et un stroma de cassure ocracée. Les fructifications ont une double teinte, rose et verte. Le pied, non cloisonné, est terminé par un renflement peu accusé couvert de basides globuleuses ; les stérigmates sont courts, les spores rondes et leur surface est hérissée de petites pointes. Un pigment rouge vif remplit les basides et la tête ; on le trouve en gouttelettes dans le pied ; les spores sont vertes, d'une dimension de 2 μ, 6. Il nous a été impossible de rapprocher ce champignon d'une espèce connue ; nous l'appellerons *Sterigmatocystis bicolor*.

Dans tous les milieux, ces caractères de forme et de structure ont varié, sauf pourtant la dimension des spores. En particulier, dans une solution sucrée, nous avons obtenu des formes très simples réduites à de courts filaments ramifiés au sommet. Entre cette forme extrême et la forme origine, nous avons rencontré toutes les transitions, comme pour le *Stérigmatocystis alba*.

Nous avions ici à examiner un caractère absent dans l'exemple choisi pour type, la présence d'un pigment. Ce pigment appartient à la catégorie des *lipochromes* ou « Fettfarbstoffe », ces substances colorantes rouges ou jaunes qu'on trouve dans les cellules vivantes dissoutes dans les corps gras. Dans un certain nombre de cas, ce pigment est dissous dans le liquide de culture : c'est ainsi que le jus de raisin prend une belle coloration rose. A propos de

la distribution de ce pigment, nous croyons devoir placer ici une remarque, nous renseignant davantage sur sa nature ; sa présence dans le thalle est corrélative de ce fait que les hyphes du Champignon sont réunies en cordons, qu'il y a fasciation. Des hyphes isolées semblent incolores ; elles sont roses, *chacune isolément*, quand elles font partie d'un faisceau. En outre, il arrive dans toutes les cultures que le thalle, dans son développement, vient, pour ainsi dire, butter contre la paroi du tube : au contact de cette paroi se manifeste une pigmentation rouge intense. On sait enfin que le stroma est toujours plus ou moins coloré, alors qu'en général le mycélium est incolore. Ces phénomènes sont probablement en rapport avec la nature d' « excreta » des pigments : l'excrétion se fait par toute la surface de la plante ; or, si un filament est isolé, le produit de l'excrétion s'élimine facilement, puisqu'il y a une grande surface libre ; au contraire, dès que, par un contact plus ou moins étendu, cette surface libre est réduite, souvent même réduite à zéro, on comprend que le pigment demeure en place. Quoi qu'il en soit, la *couleur de ce pigment a varié*, mais entre des limites assez rapprochées. Ainsi :

Culture sur glucose : Stroma *blanc* avec taches *roses;*
fructification *vert pâle.*
Culture sur gélatine : Stroma *jaune brun;*
fructification *vert foncé.*

Ce sont les deux plus grandes variations qui aient été obtenues. Une circonstance qui a particulièrement occasionné des changements de couleur est la culture en tube paraffiné. Ainsi, dans une solution de lévulose en tube ordinaire, on a un certain nombre de petits îlots gris brun, très foncés au centre, et de spores vertes. Quand le semis est effectué dans un tube, qu'on bouche ensuite hermétiquement, ce sont au contraire des îlots roses dont le centre est très foncé, avec des spores de couleur intermédiaire entre le fauve et le rose.

En somme, pour tout ce qui est des caractères autres que ce dernier, nous obtenons des variations qui viennent à l'appui des conclusions relatives au *Sterigmatocystis alba*. Quant au caractère plus spécial de notre nouveau *Sterigmatocystis*, il n'est pas étonnant de le voir varier ; que la matière excrétée change avec

l'aliment, ceci s'observe chez tous les êtres vivants. Cette variation peut ne pas correspondre à un changement dans le protoplasma, qui, restant identique à lui-même, utilise simplement d'une façon différente des aliments différents.

Nous terminerons cet examen du second *Sterigmatocystis* en disant qu'il n'a pas donné de sclérotes ni de forme parfaite.

Le troisième *Sterigmatocystis* étudié, voisin de *S. fusca*, présentait un stroma blanc et des têtes sporifères brun foncé ; nous l'avons trouvé sur des tranches de citron moisi. Nous n'en parlons que pour nommer le sujet d'une troisième série d'expériences dont les résultats concordent parfaitement avec les précédents et indiquer trois particularités intéressantes qui lui sont spéciales.

1° La couleur brune de ses spores s'est maintenue la même dans toutes les cultures. Nous avons appelé l'attention sur la constance du diamètre des spores ; c'est ici une seconde propriété, relative au protoplasma et à la membrane, qui demeure constante. D'ailleurs, dans le champignon précédent, les variations de la couleur n'ont été dans la spore que des variations d'intensité.

2° Une seconde remarque se rapporte à l'évolution d'une culture. Quand la culture vieillit, il se passe, pour beaucoup de filaments mycéliens, alors même qu'ils sont isolés, ce que l'on observe dans la formation d'un sclérote. Leur membrane prend une épaisseur trois à quatre fois plus grande, ce qui constitue de solides cordons. On a, pour ainsi dire, alors des *sclérotes formés d'une file d'articles*. Il ne s'agit pas là d'hyphes épuisées qui durcissent en vieillissant : les régions en question sont encore parfaitement en vie ; la troisième observation que nous présentons le montre.

3° Sur le mycélium constitué par de semblables hyphes, se développent, en beaucoup d'endroits, des filaments étroits, à membrane mince, contenu clair, qui s'entortillent autour des premiers, comme une tige volubile autour de son support ; ils se ramifient et les rameaux se comportent de même. Ce mycélium secondaire forme parfois des buissons très touffus. Souvent cette prolifération se manifeste aux endroits où s'élève un pied sporifère maintenant vide ; c'est dans la cavité du pied que plus d'une fois s'allongent de minces filaments, ils y donnent même des fructifications rudimentaires réduites à une ou deux basides avec stérigmates commençant à bourgeonner.

Nous avons, avec le troisième *Sterigmatocystis*, réalisé des cultures en liquide agité ; elles nous ont fourni les mêmes résultats que le *Sterigmatocystis alba*.

Sans revenir ici sur les actions du milieu, résumons par un un schéma ce que l'étude des variations, poursuivie avec ces trois *Sterigmatocystis*, peut nous donner relativement aux divers stades par lesquels cette forme a dû passer ; ce schéma est représenté fig. 2.

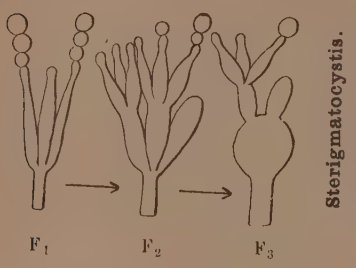


Fig. 2.

Autant la forme F_1, avait de spores de diamètres différents, autant elle a produit de *Sterigmatocystis* différents à ce point de vue.

Une étude de *Sterigmatocystis* appelle une étude d'un genre qui a une grande ressemblance avec le premier, et qu'on pourrait prendre pour une forme du premier.

On comprend dans le genre *Aspergillus* un certain nombre de formes qui toutes ont un appareil reproducteur constitué par un gros filament dressé renflé en une tête qui est couverte de stérigmates avec chapelets de spores. Nous avons étudié deux de ces formes : l'une à spores jaunes présentant un grand nombre de caractères communs avec *A. flavescens*, l'autre à spores vertes se rapprochant beaucoup d'*A. fumigatus*. Elles ont été cultivées dans des conditions aussi variées que les précédentes et nous sommes arrivés à ce résultat :

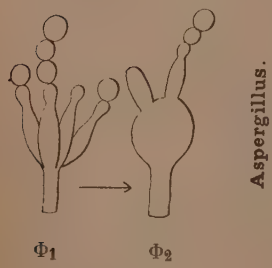


Fig. 3.

Le thalle demeure filamenteux articulaire, avec variation continuelle suivant le milieu de la forme et de la dimension des articles.

L'appareil reproducteur présente des formes qui oscillent entre Φ_1 et Φ_2.

Φ_1 et Φ_2 sont deux stades de l'évolution de la plante, ce que nous pouvons exprimer par le schéma de la fig. 3.

Donc *Aspergillus* et *Sterigmatocystis* dérivent de formes F_1 et Φ_1, très diverses d'ailleurs.

— L'un des deux *Aspergillus* (*A. flavescens*), nous a fourni une observation intéressante sur la vie en espace clos. Un tube de culture sur carotte, T, avait été, après complet développement, fermé à la paraffine. Au bout d'un an, il présentait à peu près le même aspect, tandis qu'une culture de même date, T', laissée dans les conditions ordinaires, était réduite à un amas de spores desséché. Nous fîmes un semis des spores T dans un tube frais, et, comparativement, un semis des spores T'. Dans le premier cas, il se développa un très abondant mycélium avec fructification vert foncé, dans le second cas un mycélium chétif avec fructifications vertes peu abondantes. Il n'était d'ailleurs pas nécessaire de prendre une culture ordinaire de même date que la culture fermée pour avoir une différence sensible. Déjà, en semant des spores d'une culture ordinaire, vieille seulement de quatre mois, nous avions un plus faible développement que dans le premier cas. Donc les spores se conservent beaucoup mieux et fort longtemps en espace fermé ; c'est ce que M. Roux (1) a montré pour la Bactéridie charbonneuse ; et c'est ce que l'on connaît bien dans le cas des graines des plantes Phanérogames.

Enfin, nous avons répété un grand nombre des expériences précédentes, en particulier toutes celles du chapitre premier, sur des Champignons non moins répandus et non moins intéressants par conséquent que les *Aspergillus* et *Sterigmatocystis*. On les range dans le genre *Penicillium*.

Nos recherches ont porté sur deux *Penicillium* ; nous insisterons particulièrement sur l'un d'entre eux, qui s'est présenté dans des conditions peu ordinaires. Il a été recueilli par nous sur des échantillons de Canne à sucre malade venus de la Martinique. Dans les cavités des tiges creusées par les « borers » se trouvait en assez grande quantité, appliqué contre le bois, un feutrage d'un beau jaune ; c'était, en regardant de plus près, un amas de petits coussinets ronds, d'un millimètre au plus, serrés les uns contre les

(1) Annales de l'Institut Pasteur, 1887.

autres. Beaucoup laissaient au doigt une poussière jaune. Cette poussière, au microscope, se montrait formée d'asques ovales ou rondes renfermant chacune six spores.

Nous en fîmes des semis sur fragments de canne à sucre stérilisés et sur tous les autres milieux employés plus haut. Nous obtenions partout les têtes fructifères en pinceau caractéristiques d'un *Penicillium*, qui d'ailleurs ne tarda pas à produire dans la plupart des tubes d'abondantes fructifications d'une autre nature, semblables à celles que nous avions trouvées sur la Canne. Il y a donc deux sortes de fructifications : la première est ce qu'on appelle forme conidienne, la seconde est une forme parfaite, constituée par des périthèces.

Examinons par la même méthode que précédemment un certain nombre de ces cultures.

1° Cultures de *Penicillium* en liquides sucrés (Glucose, Lévulose, Saccharose).

(Pl. 16, fig. 23 et 24).

Au bout de dix jours, la surface du liquide est voilée par un léger stroma orangé portant un peu partout des têtes fructifères, et, sur la plus grande partie de son étendue, des périthèces, sous l'aspect de nombreux points jaunes.

Les filaments du thalle sont étroits (moins de 2 μ), de calibre uniforme, sans ramification sur de grandes longueurs, très sinueux, fort enchevêtrés, souvent anastomosés. Les cloisons sont rares ; assez fréquemment ils présentent une fasciation, mais sur de faibles longueurs. Le stroma se distingue uniquement par un enchevêtrement plus grand encore, avec pigmentation jaune orangé.

Les fructifications ont les caractères suivants : de longs filaments dressés, simplement deux fois plus larges que les hyphes végétatives, portent, à une certaine distance au-dessous du sommet, un verticille de quatre à cinq branches identiques à l'axe ; chacune de ces branches se ramifie au sommet en quatre ou cinq branches plus étroites et de même longueur : à leur extrémité atténuée, s'attache un chapelet de spores. Un verticille semblable, mais de

dimensions réduites, termine l'axe : les spores sont ovales : elles ont 2 μ de long sur 1 μ de large, leur couleur est verte.

Les périthèces ne sont pas autre chose que des régions plus compactes du stroma, des filaments formant une pelote assez serrée. Leur surface a la même structure que le stroma, mais, à l'intérieur, se trouvent des filaments de nature spéciale, sur lesquels sont insérées les asques : ils sont très contournés, très ramifiés, d'un calibre fort irrégulier, tantôt minces comme des fils, tantôt élargis en ampoules ; les asques ne pas sont autre chose que les plus grosses de ces ampoules ; leur membrane est mince, les six spores ont au contraire une membrane dont l'épaisseur est le septième du grand diamètre. Toutes parties du périthèce contiennent un pigment jaune soluble dans l'alcool.

La plante présente donc la diagnose suivante :

Thalle. — Filaments à longs articles, étroits, sinueux. Stroma peu différencié ;

Appareil reproducteur. — Filament large dressé, portant deux verticilles de 4-5 branches munies de 4-5 rameaux sporifères, chapelets de spores (Conidies) de 2 μ sur 1 μ, périthèces formés de pelotes rondes de filaments, ramifiés intérieurement en branches ascogènes ; asques ovales à 6 spores de 3 μ sur 2 μ,5.

Pigmentation jaune dans toutes les parties compactes.

2° Culture du *Penicillium* sur carotte

Les caractères se résument en :

Thalle. — Filaments à articles moins longs, étroits, peu sinueux. Stroma très épais, différencié, orangé vif.

Fructifications. — Tête conidienne à dimensions plus grandes et spores de mêmes dimensions. Périthèces identiques moins nombreux.

3° Culture du *Penicillium* sur gélatine nutritive (Pl. 16, fig. 25).

La culture est très différente des premières.

A la surface de la gélatine s'étend un mince stroma blanc avec

fructifications brunes. Ce stroma offre au microscope un aspect tout à fait caractéristique : des filaments un peu plus gros que dans la culture sur liquides sucrés, produisant des rameaux plus étroits, ceux-ci à leur tour se ramifiant en de plus étroits encore, et ainsi de suite ; les filaments de tous les ordres sont d'ailleurs, à part la dimension, semblables entre eux, très tortueux, peu cloisonnés. Les fructifications consistent en des verticilles de trois branches portant des chapelets de spores et supportées par des filaments semblables à ceux du thalle. Les spores n'ont pas varié.

Donc :

Thalle. — Filaments très ramifiés, de calibre décroissant.

Têtes conidiennes à un verticille de trois branches terminées par des spores. Point de périthèces.

4° Cultures de *Penicillium* sur sels minéraux

a) *Azotate de potasse* (Pl. 16, fig. 27).

C'est surtout le thalle, ici, qui présente une constitution spéciale ; les filaments sont aussi étroits que dans la culture sur glucose, mais souvent fasciés en minces cordons, et en outre, qu'ils soient isolés ou forment la périphérie d'un de ces cordons, ils développent en grand nombre de petites proéminences de forme variable, en général larges à la base, atténuées à l'extrémité. Cela donne à l'appareil végétatif un aspect caractéristique ; nous n'avons pu nous rendre compte de la cause de cette modification.

La plante n'a pas fructifié ; la culture se réduit à un stroma blanc dont la surface est finement chagrinée.

a) *Azotate d'ammoniaque.*

Dans la solution de ce sel, il ne s'est pas développé davantage de conidies ou de périthèces ; on obtient un énorme flocon de mycélium remplissant tout le tube, opalescent, et comme formé de couches minces superposées.

5° Cultures de *Penicillium* en tubes fermés.

D'une façon générale, ces cultures présentent une réduction dans toutes leurs dimensions, comme dans le cas des *Sterigmatocystis* et *Aspergillus*. Mais il y a ici des modifications spéciales qui ont leur intérêt au point de vue de la variabilité de la plante ; l'intérêt en est moins immédiat quant à l'action du milieu, dont il est peu aisé de se rendre compte.

Dans les cultures sur lévulose ou sur glucose, c'est le thalle (Pl. 16, fig. 26) qui est à considérer particulièrement : il est formé de faisceaux de filaments qui décrivent des spirales à très petit rayon et plus ou moins serrées, cela souvent sur une grande partie de leur longueur. Cette forme des filaments s'observe encore, mais à un degré moindre, dans la culture sur gélatine en tube fermé. Certes, il est difficile de voir même dans un examen minutieux, la moindre ressemblance (en dehors de la structure filamenteuse articulaire) entre ce thalle et celui des cultures précédentes.

Dans les tubes de riz, on constate également, en même temps qu'une légère fasciation, une grande sinuosité dans la course des filaments, mais ce sont les fructifications qui se distinguent surtout. Au lieu d'avoir deux verticilles, elles n'en ont qu'un, mais qui comprend un plus grand nombre de branches : il y a réduction dans le développement en longueur avec maintien de la tendance à produire malgré cela le même nombre de branches sporifères.

L'action du milieu limité se manifeste enfin dans toutes les cultures en tube fermé par des périthèces plus nombreux que dans les tubes ouverts, alors qu'au contraire les fructifications conidiennes sont moins abondantes.

Telles sont les variations principales observées dans nos cultures de *Penicillium*. En aucun cas, le champignon ne s'est suffisamment rapproché d'une forme connue de *Penicillium* pour que nous puissions le placer dans la classification. Maintenu indéfiniment sur la Canne à sucre par exemple, il constituerait une espèce nouvelle, que nous appellerons *Penicillium Sacchari*.

Nous résumerons ses variations dans le tableau suivant :

MILIEUX	THALLE		APPAREIL REPRODUCTEUR	
	Mycelium	Stroma	Tête conidienne	Périthèces
1 Liquides sucrés	articl. longs, étroits, sinueux.	peu différencié.	2 verticilles de 4-5 br. à 4-5 stérigm. Spores vertes 2μ sur 1μ	pelotes ascophores. 6 spores
2 Carotte	articles plus courts.	épais, orange.	2 verticilles de 4-5 br. à dim. plus grandes, Spores vertes 2μ sur 1μ	id.
3 Gélatine	articles longs.	mince, blanc.	1 verticille de 3 br. sporif. Spores brunes 2μ sur 1μ	id.
4 Sels minéraux	id.	faisceaux à émergences.	o	o
5 Tubes fermés de glucose	id.	faisceaux sinueux.	comme 1, avec dim. réduites, Spores vertes 2μ sur 1μ	comme 1.

Ce sont les caractères établis, fixés dans chaque condition de milieu. Dans l'ordre de variabilité, on peut les classer ainsi (en commençant par ceux qui varient le moins) :

1° Structure du thalle ;

Ramification verticillée de l'appareil conidien.

Dimension des conidies.

Nombre et dimensions des ascospores.

2° Nombre des verticilles ;

3° Ordre du rameau sporifère (2e ordre) ;

4° Nombre des branches d'un verticille et des rameaux de premier ordre ;

5° Dimensions des branches et rameaux.

L'adaptation a exigé un grand nombre de cultures successives, nous avons pratiqué pour chaque cas une quinzaine de cultures environ. En étudiant alors l'ordre dans lequel varient les carac-

tères, nous avons constaté, dans le cas d'une culture sur gélatine par exemple, où la variation a été la plus grande :

1° Dimensions des branches et rameaux ;
2° Nombres ;
3° Ordre des rameaux sporifères ;
4° Nombre des verticilles.

De la sorte, nous classons les caractères par ordre d'importance, et, en même temps, nous pouvons dire que l'évolution de la forme Penicillium a pu être ce qu'indique le schéma de la fig. 4.

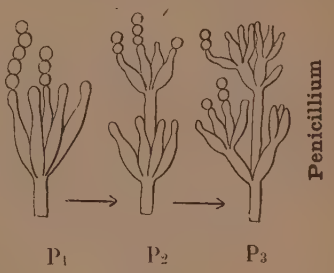


Fig. 4.

Nous partons toujours de la même forme origine ; la forme représentée par F_1, Φ_1, P_1 est l'origine commune des trois formes *Sterigmatocystis*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Enfin, en étudiant l'évolution d'une culture sur un milieu déterminé, nous avons vu les mêmes stades se succéder dans le même ordre pour donner l'appareil reproducteur ; parfois pourtant se montrent de légères interversions.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les Champignons que nous venons d'étudier ont manifesté une *grande variabilité* lorsque nous avons modifié leurs conditions d'existence : ainsi les spores d'un *Sterigmatocystis alba* ont produit sur chaque milieu où elles ont été semées (sucres, amidon, carotte, pomme de terre, jus de carotte, gélatine, sels minéraux, — liquide agité) une forme différente. Ces transformations *n'ont pas été immédiates* : le premier semis sur l'un quelconque de ces milieux a donné une plante intermédiaire entre le *Sterigmatocystis* origine et la forme définitive; les spores de cette première culture, recueillies et portées dans un autre tube contenant le même substratum, se sont développées en une plante ressemblant davantage à cette forme définitive; après un certain nombre de cultures pratiquées de la sorte, on a obtenu la forme définitive, *qui s'est maintenue* identique dans toutes les cultures suivantes. Les mêmes phénomènes d'adaptation et de persistance de la forme prise à la suite de cette adaptation se sont manifestés pour les autres espèces étudiées, appartenant aux genres *Sterigmatocystis*, *Aspergillus* et *Penicillium*.

Quant à la nature des formes diverses obtenues, voici ce qu'il a été constaté d'essentiel, en partant par exemple du *Sterigmatocystis alba*. Le genre *Sterigmatocystis* est, comme on sait, caractérisé par l'appareil sporifère suivant : un filament dressé dont l'extrémité renflée en une tête porte de courts rameaux (basides) divisés en ramuscules (stérigmates) munis chacun d'un chapelet de spores. Ces *caractères de genre se maintiennent* le plus souvent; pourtant, dans les liquides sucrés, les fructifications ne présentent ni tête ni basides, ce sont des pinceaux de filaments sporifères (caractères du genre *Penicillium*); dans les solutions salines, elles se réduisent à un filament sporifère unique. Nous arrivons aux mêmes résultats pour le genre *Aspergillus*. Dans le cas du *Penicillium*, les caractères de genre se sont conservés dans tous les milieux. Mais chez toutes ces plantes, les caractères dont les mycologues se servent pour distinguer les espèces ont varié sans cesse avec le substratum et les conditions de l'atmosphère du tube de culture. Par conséquent, si une moisissure se développe à l'air libre, auquel cas ses

spores se disséminent sur les milieux les plus divers, où elles sont susceptibles de germer, elle peut ne se retrouver jamais avec les caractères qu'elle possède à un moment donné. Donc, une moisissure rencontrée dans la nature pourra souvent n'être pas identique à une espèce décrite dans un livre de détermination.

Enfin la fréquence des variations et surtout l'ordre où elles se sont produites nous ont permis de formuler une hypothèse relative à l'évolution de ces plantes : les premières moisissures apparues dans le temps auraient eu un appareil sporifère simplement constitué par un filament dressé portant des chapelets de spores.

Sans pouvoir toujours déterminer avec certitude la cause de telle ou telle structure d'une forme obtenue, nous avons cependant montré l'influence de certains facteurs.

Avec un milieu homogène, liquide agité ou quelquefois liquide au repos, s'est manifesté le développement égal en tous sens sous la forme de *sphères* ou de thalle à *articles arrondis* ; les cultures de *Sterigmatocystis* faites en tubes ou ballons continuellement secoués, et composées de petites masses sphériques, en sont l'exemple le plus frappant. Dans ces mêmes expériences avec liquides nutritifs agités, où entrent en jeu des chocs et des frottements plus ou moins violents, les actions mécaniques ont déterminé la production d'un *appareil de résistance puissant* : les membranes de la plante sont très épaisses, le cloisonnement abondant, la ramification serrée. Lorsque nous avons introduit dans le liquide en mouvement un obstacle fixe, il y a eu *fixation de la plante,* il ne s'est pas formé de sphères.

Entre toutes les conditions physiques créées par l'agitation, il était particulièrement intéressant de considérer le changement continuel d'orientation par rapport à la direction constante de la pesanteur ; nous avons montré qu'il en résultait une plus grande vitesse de croissance. Ces dernières expériences ont été faites pour deux *Sterigmatocystis*.

Nous ne nous hasarderons pas à étendre à d'autres plantes que les Champignons étudiés les conclusions que nous avons formulées, nous nous contenterons d'avoir indiqué l'influence très grande du milieu sur la forme et la structure des organismes dans les cas que nous venons de signaler.

EXPLICATION DES PLANCHES 12 A 17.

Planche 12.

Fig. 1. — *Sterigmatocystis alba.* Fructification d'une culture sur pomme de terre. Gr. = 600.

Fig. 2. — Cellules de pomme de terre recouvertes par le mycélium du *Sterigmatocystis alba* ; *a* : Gr. = 120 ; *b* : Gr. = 660.

Fig. 3. — Vue d'ensemble du Champignon à un stade antérieur. Gr. = 300.

Fig. 4. — Fructification correspondant à ce stade. Gr. = 1000.

Fig. 5. — Structure du *Sterigmatocystis alba.* Gr. = 720.

a : extrémité d'un filament du thalle, avec noyaux ;

b : portion de filament plus âgé ;

c : premier stade d'une fructification.

Planche 13.

Fig. 6. — *Sterigmatocystis alba.* Fructification jeune d'une culture sur carotte. Gr. 600.

a : mycélium ; *b* : stroma ; *c* : hyphes superficielles.

Fig. 7. — Culture du Champignon développée en sphères dans un tube contenant du jus de carotte qui a été soumis à une agitation continue de faible intensité. Grandeur naturelle.

Fig. 8. — Culture du Champignon développée en sphères plus petites et plus compactes dans un tube contenant du jus de carotte qui a été soumis à une agitation continue intense. Grandeur naturelle.

Fig. 9. — Secteur d'une sphère jeune, montrant le résultat du développement de deux spores, qui occupent le centre. Gr. = 700.

Fig. 10. — Fructification de la culture en liquide agité. Gr. = 350.

a : pied sporifère très cloisonné ;

b : pied sporifère à membrane très épaisse.

Fig. 11. — Portion de sclérote d'une culture en liquide agité. Gr. = 660.

Fig. 12. — Portion de sclérote d'une culture ordinaire âgée. Gr. = 660.

Fig. 13. — Thalle de *Sterigmatocystis alba* cultivé dans du jus de carotte contenant un morceau de bois fixe et soumis à une agitation continue.

Planche 14.

Fig. 14. — *Sterigmatocystis alba.* Vue d'ensemble d'une culture sur glucose. Gr. = 1100.

Fig. 15. — Forme d'adaptation du Champignon à la vie en liquide sucré. Gr. = 1100.

Fig. 16. — Autre forme d'adaptation succédant à la première. Gr. = 1100.

Fig. 17. — Vue d'ensemble d'une culture du Champignon sur saccharose. Gr. = 1100.

Fig. 18. — Vue d'ensemble d'une culture sur empois d'amidon. Gr. = 1100.

PLANCHE 15.

Fig. 19. — Vue d'ensemble d'une culture de *Sterigmatocystis alba* sur azotate d'ammoniaque. Gr. = 1000.

Fig. 20. — Vue d'ensemble d'une culture sur azotate de potasse. Gr. = 1320.

Fig. 21. — Vue d'ensemble d'une culture sur phosphate d'ammoniaque. Gr. = 1000.

Fig. 22. — Vue d'ensemble d'une culture sur gélatine nutritive. Gr. = 660 A droite sont figurées des hyphes d'une culture faite dans un large tube.

PLANCHE 16.

Fig. 23. — *Penicillium Sacchari*. Vue d'ensemble d'une culture sur glucose. Gr. = 1500 (sans les périthèces).

Fig. 24. — Portion du tissu ascogène d'un jeune périthèce. Gr. = 1320.

Fig. 25. — Vue d'ensemble de la culture du Champignon sur gélatine nutritive. Gr. = 2000.

Fig. 26. — Mycélium d'une culture sur glucose en tube fermé. Gr. = 1320.

Fig. 27. — Mycélium d'une culture sur azotate de potasse. Gr. = 1320.

PLANCHE 17.

Vue d'ensemble des appareils pour la culture du *Sterigmatocystis alba* en liquide agité.

M : moteur à eau.

B : ballon de culture agité par le mouvement de ce moteur.

B' : ballon fixe.

R : roue tournant d'un mouvement lent et portant un paquet de tubes de cultures, à côté se trouve un paquet identique fixe.

E : électro-aimant.

T : tube de culture relié à l'interrupteur de l'électro-aimant et secoué par les battements de l'interrupteur.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Zoologie. — Du Mésoderme ; son origine, formation du cœlome.

Géologie. — Terrains Jurassiques du Boulonnais.

Vu et approuvé :
Paris, le 28 avril 1897,
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
G. DARBOUX.

Vu et permis d'imprimer,
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

LILLE. — IMP. LE BIGOT FRÈRES.

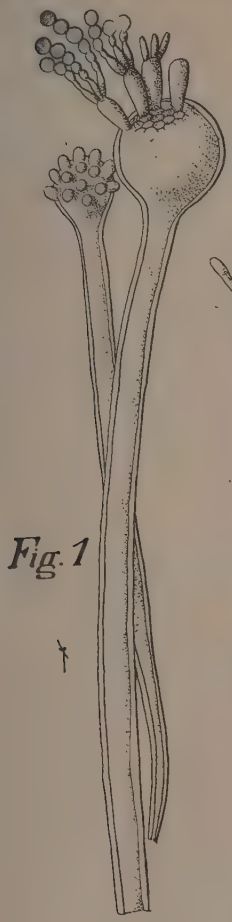


Fig. 1

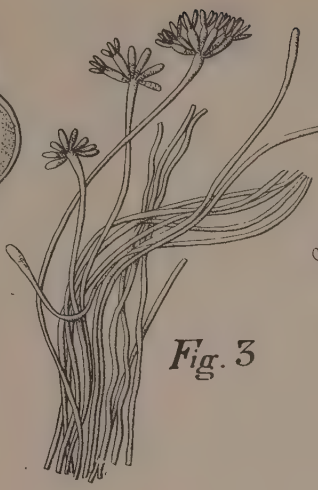


Fig. 3

Fig. 4

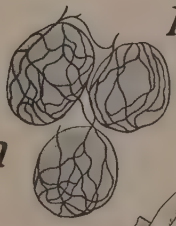
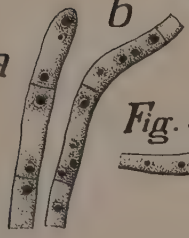


Fig. 2

a

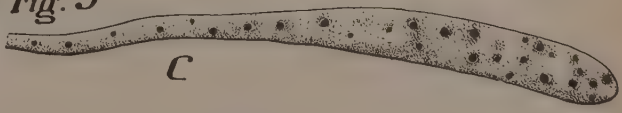
b



a

b

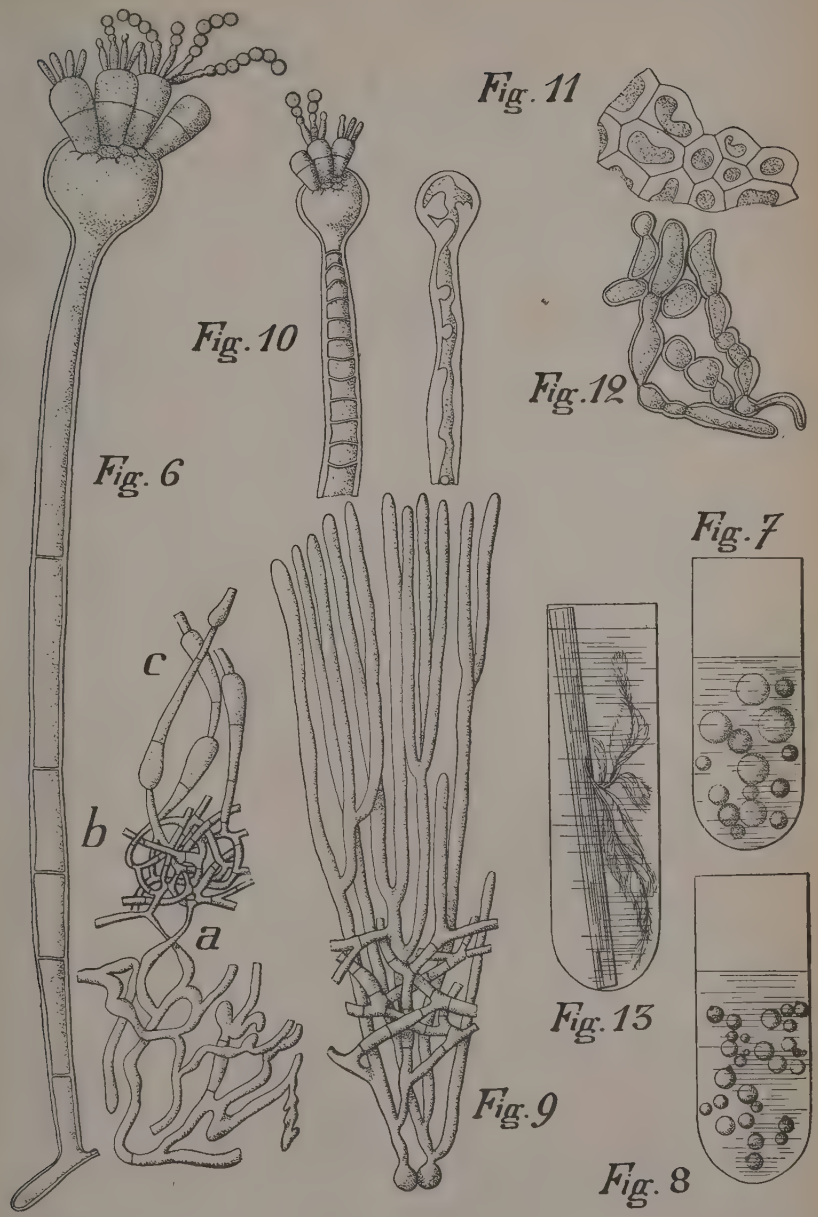
Fig. 5



c

J. Ray del. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Bertin sc.*

Sterigmatocystis alba.



J. Ray del. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Bertin sc.*

Sterigmatocystis alba.

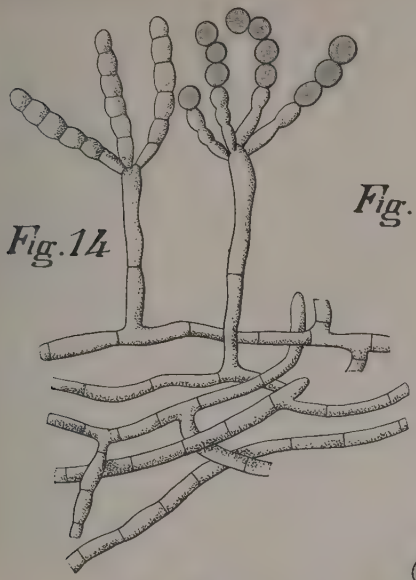


Fig. 14

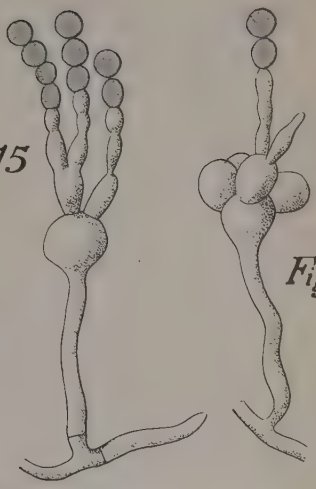


Fig. 15

Fig. 16

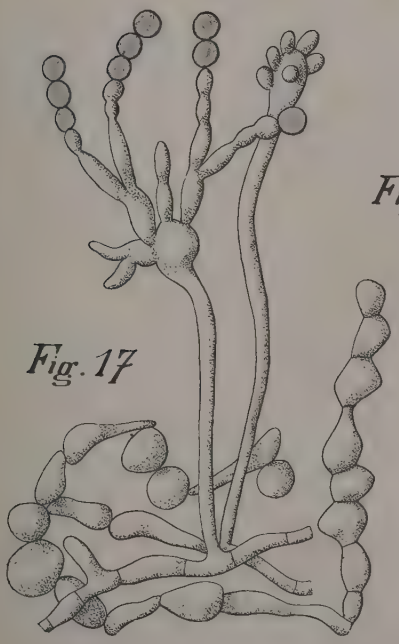


Fig. 17

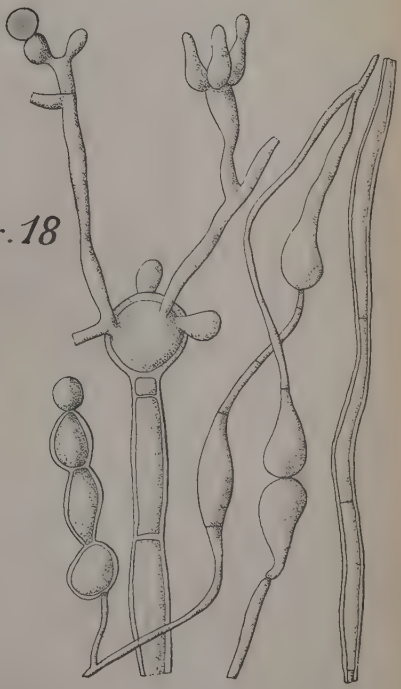


Fig. 18

J. Ray del. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Bertin sc.*

Sterigmatocystis alba.

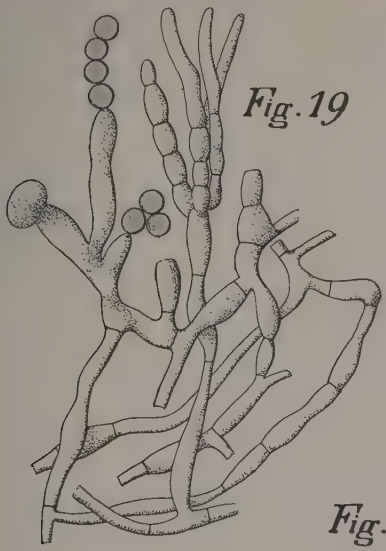


Fig. 19

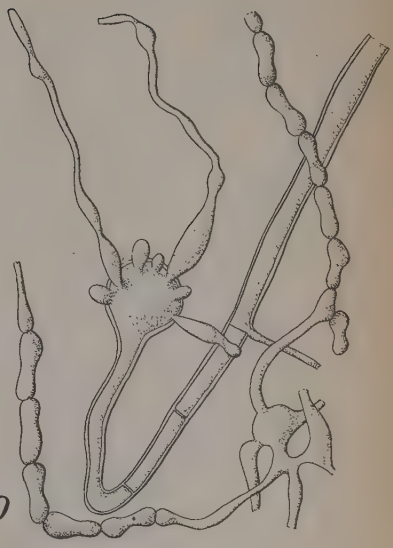


Fig. 20

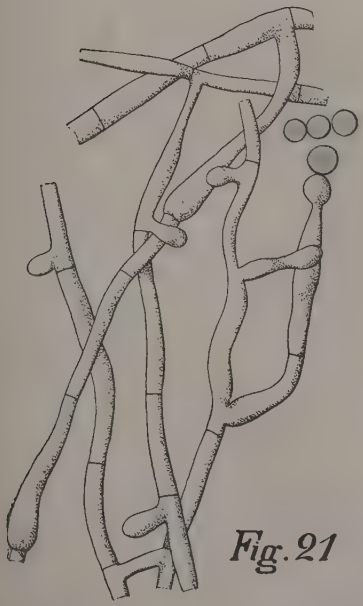


Fig. 21

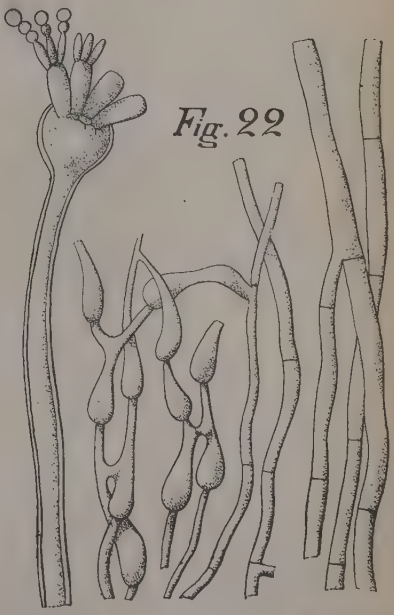


Fig. 22

J. Ray del. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Bertin sc.*

Sterigmatocystis alba.

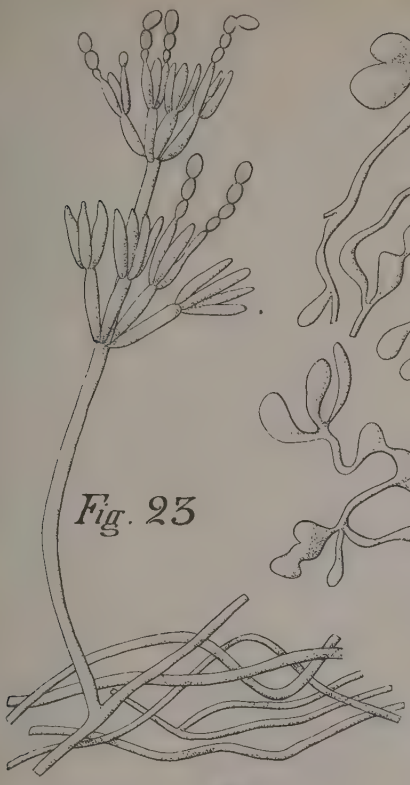


Fig. 23

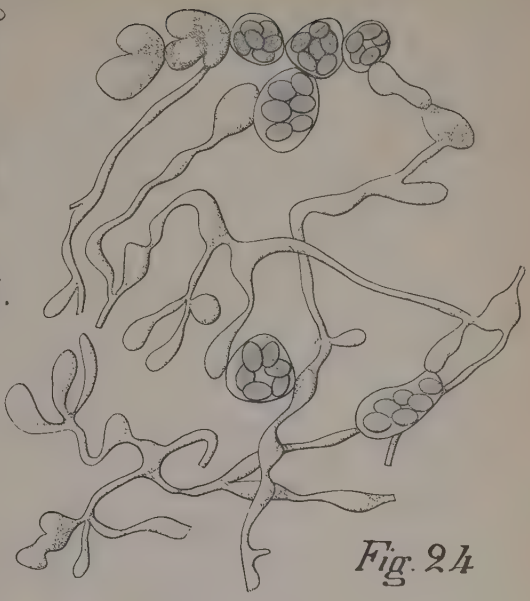


Fig. 24

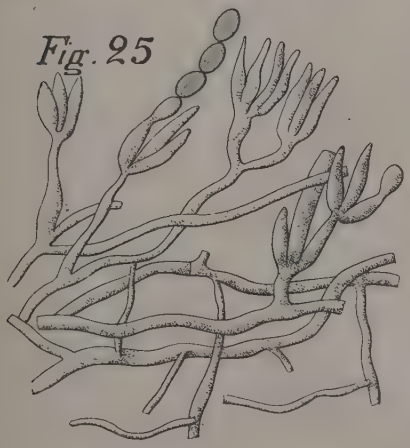


Fig. 25

Fig. 26

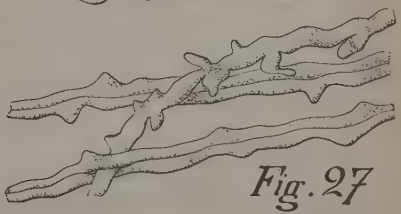
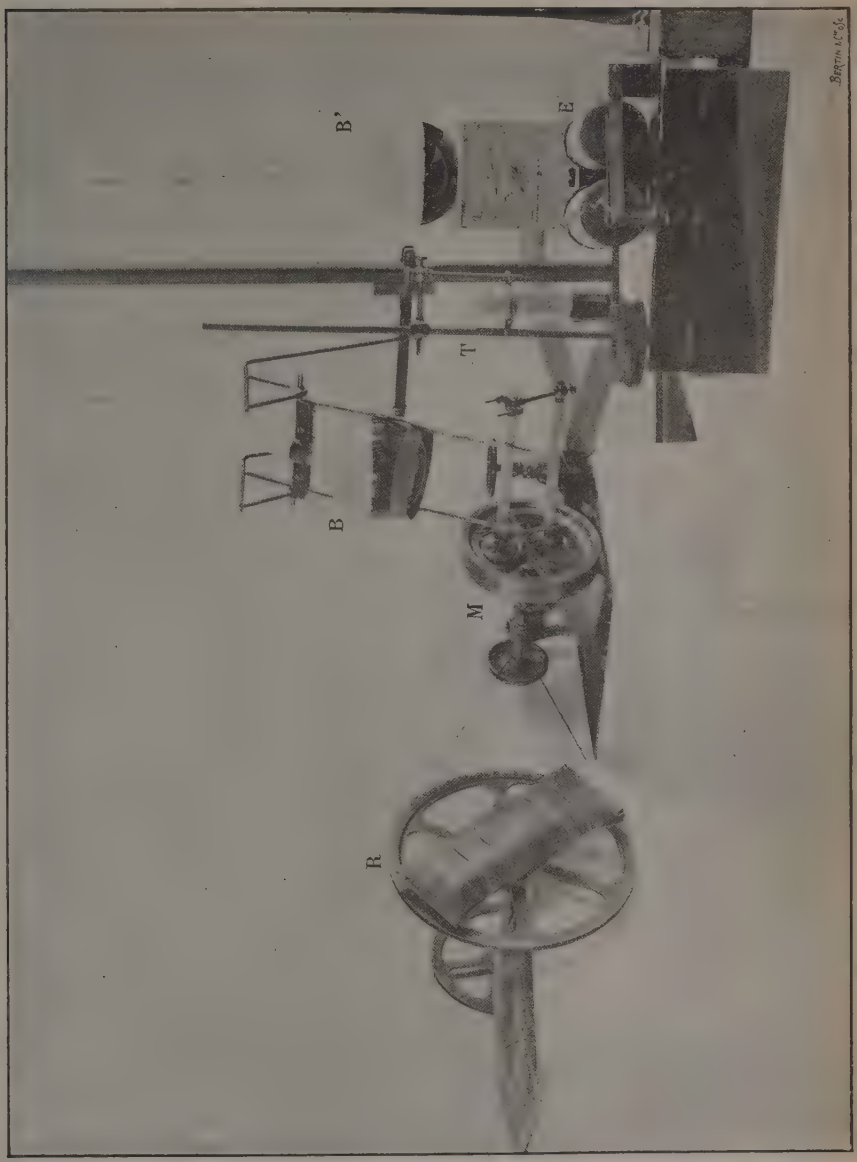


Fig. 27

J. Ray del. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Berlin sc.*

Penicillium Sacchari.



J. Ray, phot. *Imp. Le Bigot frères.* *A. Bertin sc.*

Appareils pour cultures en liquides agités.